



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA



Métodos “verdes” de produção de nanomateriais que promovem nanotecnologias sustentáveis

Marta Sofia da Silva Mendes
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química

Orientadores:

Prof^ª Doutora Elisabete Clara Bastos do Amaral Alegria

Prof^ª Doutora Ana Paula da Costa Ribeiro

Júri:

Presidente: Prof^ª Doutora Isabel Maria da Silva João

Arguente: Prof^ª Doutora Ana Catarina Cardoso Sousa

Vogal (orientador): Prof^ª Doutora Ana Paula da Costa Ribeiro

Novembro de 2015

Agradecimentos

É com muito orgulho que vejo concluída a realização da minha dissertação de mestrado e gostaria de prestar os meus agradecimentos aqueles que deram o seu contributo e apoio para que esta minha etapa académica fosse superada.

Em primeiro lugar o meu agradecimento às minhas orientadoras neste projeto a Doutora Ana Paula Ribeiro e a Professora Elisabete Alegria. Ambas foram incansáveis para que o planeamento e organização da tese e para que todos os desafios apresentados fossem bem-sucedidos. No entanto gostaria de realçar a Doutora Ana Paula Ribeiro pelo seu acompanhamento diário e pelas suas ideias no enriquecimento científico durante trabalho experimental, nomeadamente no campo das aplicações que o meu trabalho poderia proporcionar. À Professora Elisabete Alegria pela ajuda na sistematização e correção no domínio científico do meu trabalho e pelo constante apoio e motivação. Considero ainda que o espírito de cooperação e trabalho de ambas foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e das minhas competências.

A todos os meus colaboradores do CQE que desenvolvem o seu trabalho no grupo em que fui inserida, destacando o Rogério Chay, o Dr. Anbu pela contribuição ativa e ajuda durante a execução do meu trabalho experimental, à Professora Fátima Guedes da Silva e Professor Armando J.L. Pombeiro pela simpatia e por me terem acolhido da melhor forma no grupo de investigação que coordenam. Gostaria também de agradecer à Professora Rita Pacheco, pela sua ajuda e disponibilidade para me esclarecer certos conceitos.

Agradeço também à minha Família, os meus pais e irmã, que através de todo o seu apoio e carinho me ajudaram a superar esta etapa da melhor forma.

Por fim aos meus amigos, André Gregório, Mariana Velho, Catarina Domingues, Joana Calmeiro, Rodrigo Aleixo e Patrícia Prates pelo acompanhamento e preocupação demonstrada durante todos estes meses e pelos momentos de convívio. Agradeço ainda aos amigos que criei no laboratório, em especial aos alunos de Erasmus, com os quais convivi e fizeram com que esta experiência fosse não só enriquecedora cientificamente como culturalmente.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo preparar nanopartículas utilizando uma abordagem ecológica, com base em extratos de chá que, neste caso, apresentam a função de agente redutor e agente estabilizante, através de um processo sintético simples, sem a aplicação de agentes químicos tóxicos.

Neste método “verde”, as nanopartículas de ouro e prata (AuNPs e AgNPs) foram preparadas pela redução de sais metálicos (HAuCl_4 e AgNO_3) através dos polifenóis do chá, que atuam como agente redutor e de estabilização. Foi também estudada a introdução de técnicas como os microondas e sonoquímica, na síntese das AgNPs.

Foram utilizadas diferentes técnicas tais como a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varredura (SEM), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de UV-visível (UV-Vis), difração de raios-X (XRD) e espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS) para caracterizar o tamanho e uniformidade das diferentes nanopartículas (NPs) sintetizadas.

As NPs obtidas foram testadas como catalisadores na redução de vários compostos nitro aromáticos e na redução de hexacianoferrato(III) em solução aquosa.

Para a redução de alguns dos compostos nitro foram estudados vários parâmetros como por exemplo, o tempo de reação, o tipo e quantidade de agente redutor, a forma, o tamanho ou a quantidade de AuNPs com vista à otimização das condições reacionais e estudo das propriedades catalíticas das NPs sintetizadas. Também foi estudada a reutilização de AuNPs como catalisador nesta reação.

As AgNPs também foram testadas para outras aplicações na área de catálise, tais como a condensação de Knoevenagel e a degradação de pigmentos, no entanto estas não foram bem-sucedidas.

A capacidade de ligação das NPs ao ADN (DNA-CT), numa solução tampão, foi estudada utilizando métodos como a absorvância, fluorescência, dicroísmo circular e viscosidade. A constante de ligação ao ADN e o tamanho do local de ligação, juntamente com os dados obtidos pelas outras técnicas efetuadas, sugerem que a ligação entre as NPs (Au e Ag) se efetua por intercalação.

As NPs também foram testadas relativamente à sua capacidade de ligação a proteínas (albumina do soro bovino, BSA). A sua interação foi estudada utilizando a espectroscopia de fluorescência. Os resultados indicaram que as NPs apresentam uma forte capacidade de extinção da fluorescência intrínseca da BSA e os espectros de fluorescência síncrona revelam que a interação destes dois compostos altera o microambiente da BSA, nomeadamente dos seus resíduos de triptofano e tirosina.

Palavras-Chave

Nanopartículas de ouro, Nanopartículas de prata, Síntese “verde”, Catálise, Redução de compostos nitro, ADN, BSA.

Abstract

The present work aimed to prepare nanoparticles using an eco-friendly approach based on tea extracts as a reducing and capping agent, in a simple step, without application of toxic chemicals.

In this green method, gold and silver nanoparticles (AuNPs and AgNPs) were prepared by the reduction of metal-salts (HAuCl_4 and AgNO_3) using polyphenols from the tea which act as both reducing and capping agents. Ultrasonic and microwave-assisted methods were tested to improve AgNPs synthesis. Different physical techniques such as transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, UV-Visible (UV-Vis), X-ray diffraction (XRD) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) were used to characterize the size and uniformity of the different synthesized nanoparticles (NPs).

Furthermore, the obtained NPs were used as catalysts in the reduction of various aromatic nitro compounds, and in the reduction of hexacyanoferrate(III) in aqueous solution. For the reduction of aromatic nitro compounds the effects of a variety of factors (e.g., reaction time, type and amount of reducing agent, shape, size or amount of AuNPs) were studied towards the optimization of the processes. The reusability of AuNPs as catalyst in the reduction of a nitro compound was also tested.

The AgNPs were also tested for other applications in the area of catalysis, such as the Knoevenagel condensation and the reduction of pigments, where they weren't well succeeded.

The DNA binding efficacy of the NPs with CT (calf thymus) DNA in a buffer solution was investigated using absorption, fluorescence, circular dichroism and viscosity titration methods. The DNA binding constant and binding site size and the data gathered from other techniques suggest an intercalative mode of binding to CT-DNA.

The NPs binding properties on BSA (bovine serum albumin) were also studied. The interaction between them was investigated using fluorescence spectroscopy. The analysis indicated that the NPs have a strong capability to quench the intrinsic fluorescence of BSA by static quenching mechanism. Synchronous fluorescence spectra reveal that the interaction of NPs with BSA changes the microenvironment of tryptophan and tyrosine residues.

Keywords

Gold nanoparticles, Silver nanoparticles, Green Synthesis, Catalysis, Reduction, Nitro compounds, DNA, BSA.

Glossário, Abreviaturas e Símbolos

2-, 3-, 4-AF	- 2-, 3-, 4-aminofenol
2-, 3-, 4-FD	- 2-, 3-, 4-fenilenodiamina
2-, 3-, 4-NA	- 2-, 3-, 4-nitroanilina
2-, 3-, 4-NF	- 2-, 3-, 4-nitrofenol
ADN	- ácido desoxirribonucleico
AgNPs	- nanopartículas de prata
AN	- anilina
AuNPs	- nanopartículas de ouro
BE	- brometo de itídio
BSA	- albumina do soro bovino
CD	- dicroísmo circular
CT-DNA	- ADN do timo de vitela
EDS	- espectroscopia de raios-X por dispersão de energia
Fls	- fluorescência
FTIR	- espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
máx	- máximo
MW	- microondas
NB	- nitrobenzeno
nm	- nanómetro
NPs	- nanopartículas
RMN	- ressonância magnética nuclear
SEM	- microscopia eletrônica de varrimento
TEM	- microscopia eletrônica de transmissão
Tir	- tirosina
TOF	- <i>turnover frequency</i>
TON	- <i>turnover number</i>
Trp	- triptofano
t.a.	- temperatura ambiente
u.a.	- unidades de absorvância
US	- ultrassons
UV	- ultravioleta
UV-Vis	- ultravioleta-visível
XRD	- difração de raios-X
µm	- micrómetro

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Glossário, Abreviaturas e Símbolos.....	vii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxi
I – INTRODUÇÃO	1
I.1 – Nanopartículas	3
I.2 – Propriedades das Nanopartículas	4
I.2.1 – Propriedades óticas das Nanopartículas Metálicas	4
I.3 – Síntese de nanopartículas	7
I.3.1 – Nanopartículas de Ouro	10
I.3.2 – Nanopartículas de Prata.....	11
I.4 – síntese “verde” de Nanopartículas Metálicas	11
I.5 – Aplicações das Nanopartículas	13
I.5.1 – Aplicação em Catálise	13
I.5.1.1 – Reações de Redução.....	14
I.5.1.2 – Degradação de Pigmentos.....	14
I.5.1.3 – Reações de Condensação	15
I.5.2 – Aplicação em estudos biológicos	15
I.5.2.1 – Interações com o ADN	15
I.5.2.2 – Interações com proteínas.....	17
II – RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
II.1 – Extratos de chá.....	21
II.1.1 – Testes de Detecção de Compostos	22
II.1.1.1 – Detecção de Flavonóides	22

II.1.1.2 – Detecção de compostos fenólicos.....	22
II.2 – Nanopartículas de ouro (AuNPs)	25
II.2.1 – Síntese das nanopartículas de ouro.....	25
II.2.2 – Caracterização das nanopartículas de ouro.....	26
II.2.2.1 – Métodos Espectroscópicos.....	26
II.2.2.2 – Métodos Microscópicos	28
II.2.3 – Quantificação das nanopartículas de ouro	32
II.2.4 – Estudos Catalíticos	35
II.2.4.1 – Redução do 2- e 4-nitrofenol em meio aquoso	35
II.2.4.2 – Redução da 2-, 3- e 4-nitroanilina em meio aquoso	48
II.2.4.3 – Redução do nitrobenzeno em meio aquoso.....	51
II.2.4.4 – Reutilização das AuNPs na redução do 4-NF	55
II.2.4.5 – Redução do Hexacianoferrato(III)	58
II.2.5 – Estudos de ligação ao ADN.....	60
II.2.5.1 – Análise por Espectroscopia de UV-Vis.....	60
II.2.5.2 – Análise por Dicroísmo Circular	61
II.2.5.3 – Análise por Espectroscopia de Fluorescência	62
II.2.5.4 – Análise por Viscosidade	64
II.2.6 – Estudos de ligação a Proteína.....	65
II.2.6.1 – Análise por Espectroscopia de Fluorescência	65
II.2.6.2 – Análise por espectroscopia de absorção para a BSA	66
II.2.6.3 – Análise conformacional da BSA	67
II.3 – Nanopartículas de Prata (AgNPs)	69
II.3.1 – Síntese das nanopartículas de prata.....	69
II.3.1.1 – Método Simples (MS)	69
II.3.1.2 – Síntese por irradiação Microondas (MW) e Ultrassons (US)	69
II.3.2 – Caracterização das nanopartículas de Prata	70
II.3.2.1 – Métodos Espectroscópicos.....	71
II.3.2.1 – Métodos Microscópicos	73
II.3.3 – Quantificação das nanopartículas de Prata	79
II.3.4 – Estudos Catalíticos	81
II.3.4.1 – Redução do 2- e 4-nitrofenol em meio aquoso	81
II.3.4.2 – Redução da 4-nitroanilina em meio aquoso.....	88
II.3.4.3 – Redução do nitrobenzeno em meio aquoso.....	90
II.3.4.4 – Cálculo do TOF.....	91
II.3.4.5 – Degradação de pigmentos	93

II.3.4.6 – Condensação de Knoevenagel	97
II.3.5 – Estudos de ligação ao ADN	98
II.3.5.1 – Análise por Espectroscopia de UV-Vis	98
II.3.5.1 – Análise por Dicroísmo Circular	99
II.3.5.1 – Análise por Espectroscopia de Fluorescência	100
II.3.5.2 – Análise por Viscosidade	101
II.3.6 – Estudos de ligação a Proteína	103
II.3.6.1 – Análise por Espectroscopia de Fluorescência	103
II.3.6.2 – Análise por espectroscopia de absorção para a BSA.....	104
II.3.6.3 – Análise conformacional da BSA.....	105
III – PARTE EXPERIMENTAL	107
III.1 – Materiais e equipamento	109
III.1.1 – Reagentes	109
III.1.2 – Equipamento	110
III.1.2.1 – Microscopia eletrónica de transmissão	110
III.1.2.2 – Microscopia eletrónica de varrimento	111
III.1.2.3 – Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia.....	111
III.1.2.4 – Difração de raios-X.....	111
III.1.2.5 – Espectroscopia de Infravermelhos	112
III.1.2.6 – Espectroscopia de UV-Vis	112
III.1.2.7 – Espectroscopia de Fluorescência	113
III.1.2.8 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	114
III.1.2.9 – Espectroscopia de Dicroísmo Circular	114
III.1.2.10 – Viscosidade	114
III.2 – Procedimentos	115
III.2.1 – Preparação de nanopartículas de ouro utilizando extratos de chá.....	115
III.2.2 – Preparação de nanopartículas de prata utilizando extratos de chá.....	115
III.2.2.1 – Método Simples.....	115
III.2.2.2 – Método por irradiação microondas ou por ultrassons.....	115
III.2.3 – Testes bioquímicos para deteção de flavonóides e compostos fenólicos	116
III.2.4 – Redução de compostos nitro, em meio aquoso.....	116
III.2.5 – Redução do hexacianoferrato (III), em meio aquoso	117
III.2.6 – Degradação de Corantes, em meio aquoso	117
III.2.7 – Condensação de Knoevenagel	118

III.2.8 – Estudos Biológicos – ligação das nanopartículas à estrutura do ADN	118
III.2.8.1 – Análise por Espectroscopia de UV-Vis.....	118
III.2.8.2 – Análise por Espectroscopia de Fluorescência	119
III.2.8.3 – Medições de Viscosidade	119
III.2.9 – Estudos Biológicos – ligação das nanopartículas a Proteínas.....	120
IV – CONCLUSÕES	121
V – PERSPETIVAS FUTURAS.....	125
VI – COMUNICAÇÕES.....	129
VII – BIBLIOGRAFIA.....	133
VIII – ANEXOS	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cronograma de utilização e descoberta de nanomateriais.....	3
Figura 2 - Deslocalização de elétrons no efeito do plasmão de superfície.	5
Figura 3 – Variação da banda SPR de AuNPs com diferentes tamanhos.	5
Figura 4 - Variação da cor de soluções contendo nanopartículas, de ouro e prata, com diferentes tamanhos e formas.....	6
Figura 5 - Exemplo esquemático das diferenças das metodologias <i>Top down</i> e <i>Bottom up</i> , na síntese de nanopartículas.	7
Figura 6 - Esquema da síntese de nanopartículas de prata, por redução com borohidreto de sódio e estabilização com citrato.	9
Figura 7 - Representação das forças de Van der Waals, na agregação de partículas. ^{Adap. de .}	10
Figura 8 - Diferentes modos de ligação ao ADN, verificada para dois compostos distintos (brometo de etídio à esquerda e o Hoechst 33258 à direita).....	16
Figura 9 – Formas conhecidas adoptadas pela hélice do ADN.	16
Figura 10 - Representação esquemática das várias estruturas das proteínas	17
Figura 11 – Estrutura da albumina do soro bovino.	18
Figura 12 - Exemplo da mudança de cor de um extrato de chá (chá 1), aquando a adição da solução de amónia, para a confirmação da presença de flavonóides.	22
Figura 13 - Imagens do chá 1 de diferentes concentrações, antes e após a formação de AuNPs.	25
Figura 14 - Espectro de UV-Vis para as soluções 1, 5 e 10% AuNPs (sintetizadas com o chá 1).	26
Figura 15 – Difractograma da análise XRD de uma amostra de 1% AuNPs, sintetizadas com o chá 1.....	27
Figura 16 - Imagens de TEM e respetiva distribuição do tamanho das partículas para (a,c) 1% AuNPs/chá 1 e (b,d) 10% AuNPs/chá 1.....	28
Figura 17 - Imagens de TEM e distribuição do tamanho das partículas para o extrato de chá 2 com 1% AuNPs (a, c) e 10% AgNPs (b, d).	29
Figura 18 – Imagens de SEM das AuNPs produzidas a partir dos dois tipos de chá com diferentes concentrações. a) 1% AuNPs/ chá 1 , b) 10% AuNPs/ chá 1 , c) 1% AuNPs/ chá 2 , d) 10% AuNPs/ chá 2	30
Figura 19 – Imagens de SEM com e sem a utilização do detetor de elétrons retrodifundidos para a identificação de metais na amostra das AuNPs. a) 1% AuNPs/ chá 1 b) 1% AuNPs/ chá 2	30

Figura 20 – Imagens de SEM e respectivos resultados da análise EDS a) extrato 1% de chá 1 (sem NPs); b) 1% AuNPs/chá 1; c) 1% AuNPs/chá 2.	31
Figura 21 - Análise EDS da amostra de 10% AuNPs/chá 1, em zonas diferentes. a) local onde se observam AuNPs, b) local onde não se observam AuNPs.	32
Figura 22 – Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de 1% AuNPs/chá 1. Extrato de 1% AuNPs (chá 1) (linha preta contínua); adição do 4-NF (linha preta descontínua); formação do ião 4-nitrofenolato (linha verde); progressão da reação monitorizada de 2 em 2 min. Condições reaccionais: [1% AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M; [4-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; [NaBH ₄] = $1,6 \times 10^{-3}$ M. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo de reação.....	37
Figura 23 - Espectro UV-Vis da redução do 2-NF na presença de 1% AuNPs (chá 1). Condições reaccionais: [1% AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M; [2-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; [NaBH ₄] = $1,6 \times 10^{-3}$ M. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo de reação. Extrato 1% AuNPs (linha preta contínua); adição do 2-NF (linha preta tracejada).	37
Figura 24 - Gráficos da absorvância a 400 nm vs. tempo de reação na redução do 4-NF, catalisada por a) 1 % AuNPs/chá 1, b) 5 % AuNPs/chá 1, c) 10 % AuNPs/chá 1.	39
Figura 25 - Espetros de UV-Vis da redução do 4-NF a 4-NA com diferentes concentrações de 1% AuNPs/chá 1. Condições da reação: [4-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M e [NaBH ₄] = $1,6 \times 10^{-3}$ M.	40
Figura 26 - Espetros UV-Vis da redução do 4-NF catalisada por 1% AuNPs/chá 1, com diferentes concentrações de agente redutor [NaBH ₄]. Condições da reação: [AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M e [4-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M.....	41
Figura 27 – Efeito na redução do 4-NF a 4-AF com concentrações variáveis de NaBH ₄ . ○ - [NaBH ₄] = 3×10^{-4} M; ▲ - [NaBH ₄] = 5×10^{-4} M; ◇ - [NaBH ₄] = 8×10^{-4} M; △ - [NaBH ₄] = $1,2 \times 10^{-3}$ M; ● - [NaBH ₄] = $1,6 \times 10^{-3}$ M; absorvâncias medidas ao comprimento de onda de 400 nm.....	42
Figura 28 - Espectro UV-Vis da redução do 4-NF catalisada por 1% AuNPs/chá 1 e utilizando hidrazina como agente redutor. Espectro do extrato de chá com AuNPs e 4-NF (linha verde descontínua); formação do ião 4-nitrofenolato (linha vermelha). a) gráfico da absorvância a 400 nm vs. tempo de reação.	43
Figura 29 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de 1% AuNPs/chá 2. AuNPs (linha preta contínua); adição do 4-NF (linha preta descontínua); formação do ião 4-nitrofenolato (linha roxa), progressão da reação monitorizada de 2 em 2 min. Condições reaccionais: [AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M; [4-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; [NaBH ₄] = $1,6 \times 10^{-3}$ M. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo.	43
Figura 30 – Determinação do valor de k_{app} , para a reação do 4-NF nas condições padrão ([AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M; [4-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; [NaBH ₄] = $1,6 \times 10^{-3}$ M), a partir dos valores	

de absorvância ao longo do tempo (Tabela 6, entrada 1). a) Absorvância a 400 nm vs. Tempo de reação; b) linearização de A/A_0 vs. tempo.....	45
Figura 31 - Valores k_{app} para as reações estudadas vs. a concentração de 1% AuNPs/chá 1.	46
Figura 32 - Valores k_{app} para as reações estudadas vs. a concentração de agente redutor.	47
Figura 33 - Espectros de UV-Vis da redução da a) 2-NA; b) 3-NA; c) 4-NA. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[substrato] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. 1% AuNPs/chá 1 (linha preta) ; após a adição do 4-NA (linha preta tracejada); após a adição do agente redutor (linha verde); scans de 2 em 2 min. Representação da absorvância vs o tempo, para o c.d.o. fixo de a1) 394 nm e b1) 270 nm c1) 380 nm....	49
Figura 34 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-NA catalisada por 1% AuNPs/chá 1 e utilizando trietilsilano como agente redutor. a) gráfico da absorvância a 380 nm vs. tempo de reação.....	50
Figura 35 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-NA na presença de 1% AuNPs/chá 2. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 380 nm vs. tempo.....	50
Figura 36 - Espectro de UV-Vis da reação de redução do nitrobenzeno catalisada por AuNPs. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NB] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$	51
Figura 37 - Espectro UV-Vis da reação de redução do NB catalisado por AuNPs e utilizando como agente redutor a) hidrazina, b) trietilsilano.....	52
Figura 38 - Espectro UV-Vis da reação de redução do NB na presença de 1% AuNPs/chá 2. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 272 nm vs. tempo de reação.	52
Figura 39 - Espectros UV-Vis da reutilização das 1% AuNPs/chá 1 na redução do 4-NF. a) Primeira adição de 4-NF; b) Segunda adição do 4-NF; c) Terceira adição de 4-NF; d) Quarta adição de 4-NF e posterior adição de $NaBH_4$. Todas as adições foram realizadas nas mesmas condições padrão (Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.)	55
Figura 40 – Representação gráfica da conversão obtida com a reutilização das AuNPs, na redução do 4-NF, pelo método 1. * Antes de nova adição de $NaBH_4$. ** Após nova adição de $NaBH_4$	56
Figura 41 - Espectro UV-Vis da reutilização das AuNPs na redução do 4-NF, com base no segundo método. 1% AuNPs centrifugadas com adição de 4-NF (linha preta); adição do agente redutor (linha vermelha); scans de 2 em 2 min (restantes linhas decrescentes).	57

Figura 42 – Espectro UV-Vis da reação de redução dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ por NaBH_4 catalisada por 1% AuNPs/chá 1. Condições reacionais: $[\text{AuNPs}] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} = 9,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$	59
Figura 43 - Espectro de absorção das AuNPs (6,6 μM) na ausência e na presença de quantidades incrementais de CT-DNA (0-10 μM) em 5 mM da solução tampão de Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5). as setas indicam as mudanças da absorvância do complexo perante o aumento da concentração de CT-DNA. A figura inserida demonstra a variação de $\Delta\epsilon_{\text{af}} / \Delta\epsilon_{\text{bf}}$ versus [DNA] para as AuNPs.	61
Figura 44 - Espectro de dicroísmo circular do CT-DNA, na presença de quantidades incrementais de AuNPs (0-20 μM) numa solução padrão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7.5). As setas indicam a tendência das alterações espectrais, com a adição de ADN.	62
Figura 45 - Espectro de emissão de brometo de etídio (BE) ligado ao ADN na solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5), na ausência e na presença de AuNPs. $[\text{BE}] = 3,3 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}] = 40 \mu\text{M}$, $[\text{AuNPs}] = 0-80 \mu\text{M}$. ($\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$). Gráfico de F_0/F versus [AuNPs] para a curva de extinção da fluorescência do ADN-BE, pelas AuNPs.	63
Figura 46 - Efeito de quantidades incrementais de BE e AuNPs, na viscosidade relativa do AND-CT a $25 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$. Concentração final de ADN de 0,5 mM.	64
Figura 47 - (a) Alterações visualizadas no espectro de fluorescência da BSA (1,0 μM) com o aumento da concentração de AuNPs (0-40 μM), na solução tampão 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5) ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$). (b) Gráfico da relação não-linear de Stern-Volmer de I_0/I vs. [AuNPs]. (c) Representação gráfica da relação de Scatchard de $\log I_0 - II$ vs. $\log [\text{AuNPs}]$	65
Figura 48 - Espectro de absorção UV-Vis da BSA na ausência e na presença de AuNPs na solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl (pH = 7,5).	67
Figura 49 - Espectros de fluorescência síncrona da BSA na solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl, pH = 7,5, na presença de quantidades incrementais de AuNPs (0–50 μM), a diferentes comprimentos de onda de: a) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ b) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. As setas demonstram a diminuição da intensidade com o aumento da concentração de AuNPs.	68
Figura 50 - Imagens do chá 1, antes e após a formação de AgNPs (1% AgNPs/chá 1).	69
Figura 51 – Espectro UV-Vis de diferentes tempos na síntese de 1% AgNPs/chá 1, assistida por radiação microondas.	70
Figura 52 - Bandas SPR obtidas por espectroscopia de UV-Vis das AgNPs sintetizadas pelo método simples, utilizando diferentes extratos de chá.	71

Figura 53 - Espectros de UV-Vis das bandas das AgNPs formadas através de diferentes métodos a) 1% AgNPs/chá 1; b) 1% AgNPs/chá 2.	72
Figura 54 – Difractograma da análise XRD de uma amostra de 1% AgNPs.	73
Figura 55 - Imagens da técnica TEM e distribuição do tamanho das partículas para 1% AgNPs obtidas com a) chá 1 e b) chá 2.	73
Figura 56 - Distribuição do tamanho das partículas para os diferentes extratos de chá (1%), sintetizadas pelos diferentes métodos (simples, microondas (MW) e ultrassons (US)). *As amostras quando analisadas por TEM apresentaram aglomerados com tamanhos superiores a 100 nm, impossibilitando a determinação do seu tamanho, por esta técnica.	75
Figura 57 – Distribuição dos tamanhos das 1% AgNPs/chá 1 pelo método MW a 35°C e 150°C.	76
Figura 58 - Fotografias da técnica SEM das 1% AgNPs produzidas a partir dos dois tipos de chá. a) Chá 1 ; b) Chá 2	77
Figura 59 – Imagens da análise SEM. Exemplos da utilização do detetor de elétrons retrodifundidos para a identificação de metais na amostra das 1% AgNPs sintetizadas pelo método simples. a) 1% AgNPs/ chá 3 ; b) 1% AgNPs/ chá 4	77
Figura 60 - Análise EDS das AgNPs produzidas por diferentes extratos de chá, pelo método de síntese simples. a) Chá 1; b) Chá 2; c) Chá 3; d) Chá 4; e) Chá 5; f) Chá 6.	78
Figura 61 – Espectros de UV-Vis da redução do 2-nitrofenol (2-NF) na presença de 1% AgNPs/chá 1. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,34 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[2-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo.	82
Figura 62 – Espectro de UV-Vis da reação de redução do 4-NF catalisado por 1% AgNPs/chá 1. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo de reação.	83
Figura 63 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método simples por diferentes extratos de chá: a) Chá 3; b) Chá 4 e c) Chá 6. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$	84
Figura 64 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método MW, por diferentes extratos de chá: a) Chá 1; b) Chá 4; c) Chá 5. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$	86
Figura 65 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método US por diferentes extratos de chá: a) Chá 1; b) Chá 2; c) Chá 5. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$	87

- Figura 66 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-NA catalisada por 1% AgNPs/chá 1. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NA] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 380 nm vs. tempo de reação. 89
- Figura 67 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-nitroanilina (4-NA) catalisada por 1% AgNPs sintetizadas pelo método simples e por diferentes extratos de chá: a) chá 3; b) chá 4. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. i) Absorvância a 380 nm vs. tempo de reação. 90
- Figura 68 - Espectros de UV-Vis da reação de redução do nitrobenzeno catalisada por 1% AgNPs. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$; tempo de reação= 40 min. a) Absorvância a 270 nm vs tempo de reação.. 91
- Figura 69 - Espectro UV-Vis do ensaio da degradação do corante alaranjado de metilo, durante 20 min, por radiação UV com a) extrato de chá 1 a 1%; b) 1% AgNPs/chá 1 ($[catalisador] = 5,29 \times 10^{-5} \text{ M}$); c) 1% AgNPs/chá 1 e H_2O_2 ($[catalisador] = 2,65 \times 10^{-5} \text{ M}$ $[H_2O_2] = 0,14 \text{ M}$) e d) apenas H_2O_2 ($[H_2O_2] = 0,28 \text{ M}$). ($[pigmento] = 1,18 \times 10^{-5} \text{ M}$) 94
- Figura 70 - Ensaio da degradação do corante alaranjado de metilo, durante 5 horas, por radiação de luz solar na presença de a) extrato de chá 1 a 1%; b) 1% AgNPs/chá 1 ($[catalisador] = 5,29 \times 10^{-5} \text{ M}$); c) 1% AgNPs/chá 1 e H_2O_2 ($[catalisador] = 2,65 \times 10^{-5} \text{ M}$ $[H_2O_2] = 0,14 \text{ M}$) e d) apenas H_2O_2 ($[H_2O_2] = 0,28 \text{ M}$). ($[pigmento] = 1,18 \times 10^{-5} \text{ M}$). 94
- Figura 71 - Espectro de UV-Vis do ensaio da degradação do corante alaranjado de metilo, durante 20 minutos, por radiação UV na presença de a) extrato de chá 1 a 1%; b) 1% AgNPs/chá 1 ($[catalisador] = 5,29 \times 10^{-5} \text{ M}$); c) 1% AgNPs/chá 1 e H_2O_2 ($[catalisador] = 2,65 \times 10^{-5} \text{ M}$ $[H_2O_2] = 0,14 \text{ M}$) e d) apenas H_2O_2 ($[H_2O_2] = 0,28 \text{ M}$). ($[pigmento] = 1,21 \times 10^{-5} \text{ M}$) 95
- Figura 72 – Imagens da degradação do corante azul metileno, durante 5 horas, por radiação de luz solar na presença de a) extrato de chá 1 a 1%; b) 1% AgNPs/chá 1 ($[catalisador] = 5,29 \times 10^{-5} \text{ M}$); c) 1% AgNPs/chá 1 e H_2O_2 ($[catalisador] = 2,65 \times 10^{-5} \text{ M}$ $[H_2O_2] = 0,14 \text{ M}$) e d) apenas H_2O_2 ($[H_2O_2] = 0,28 \text{ M}$). ($[pigmento] = 1,21 \times 10^{-5} \text{ M}$) 96
- Figura 73 - Espectro de absorção das AgNPs (1,6 μM) na ausência e presença de quantidades incrementais de CT-DNA (0-7,5 μM) em 5 mM da solução tampão de Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5). A seta demonstra as variações na absorvância do complexo aquando a adição incremental da concentração de CT-DNA. A figura inserida demonstra uma curva de calibração de $\Delta\epsilon_{af} / \Delta\epsilon_{bf}$ versus [DNA] para as AgNPs. 99
- Figura 74 - Espectro de dicroísmo circular do CT-DNA na presença de quantidades incrementais de (0-20 μM) numa solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5). As setas indicam a tendência do espectro aquando a adição de ADN..... 100
- Figura 75 - a) Espectro de emissão de BE ligado ao ADN, numa solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5), na ausência e na presença de AgNPs. Condições

reacionais: [BE] = 3,3 μ M, [DNA] = 40 μ M, [AgNP] = 0-220 μ M. (λ_{ex} = 510 nm). b) Representação gráfica da razão F_0/F vs [AgNPs] para a curva de extinção de fluorescência do ADN-BE, pelas AgNPs.....	101
Figura 76 - Efeito de quantidades incrementais de BE e AgNPs, na viscosidade relativa do CT-DNA a 25 (± 0.1) °C. Concentração total de ADN de 0,5 mM.	102
Figura 77 - a) Espectro da variação da fluorescência da BSA (1.0 μ M) com o aumento da concentração de AgNPs (0-40 μ M) na solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5) (λ_{ex} = 280 nm); b) Representação gráfica da relação não-linear de Stern-Volmer da razão I_0/I vs. [AgNPs]; c) Representação gráfica da relação de Scatchard de $\log I_0 - II$ vs. \log [AgNPs].....	103
Figura 78 - Espectro de absorção de UV-Vis da BSA na ausência e na presença de AgNPs, na solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl (pH = 7,5).....	104
Figura 79 - Espectro síncrono da BSA (numa solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl, pH=7,5), na presença de quantidades incrementais de AgNPs (0-50 μ M), a diferentes comprimentos de onda de a) $\Delta\lambda$ = 15 nm b) $\Delta\lambda$ = 60 nm. As setas demonstram a diminuição do valor de emissão, com o aumento da concentração de AgNPs.	105
Figura 80 – Equipamento de TEM do laboratório MicroLab do Instituto Superior Técnico (IST). ¹⁴³	110
Figura 81 - Equipamento de SEM do laboratório MicroLab do Instituto Superior Técnico (IST).	111
Figura 82 – Equipamento de FTIR do Centro de Química Estrutural (IST).....	112
Figura 83 – Espectrofotómetro de UV-Vis do Centro de Química Estrutural, IST.....	113
Figura 84 - Espectrofotómetro de Fluorescência do Centro de Química Estrutural, IST.....	113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Designação a utilizar para os diferentes extratos de chá utilizados.....	21
Tabela 2 – Resultados dos estudos bioquímicos efetuados para diferentes extratos de chá 1 %.....	23
Tabela 3 – Resultados dos estudos bioquímicos efetuados para diferentes extratos de chá 10 %.....	23
Tabela 4 – Cálculo do número de NPs formadas e do número de átomos de Au à superfície de cada NP, para as AuNPs produzidas com extratos dos chás 1 e 2.....	33
Tabela 5 - Número de nanopartículas formadas e o número de átomos de Au à superfície de cada nanopartícula, para soluções com diferentes concentrações de AuNPs produzidas com o chá 1.....	34
Tabela 6 – Valores de k_{app} das reações estudadas com diferentes concentrações de catalisador e respetivo TOF da reação.....	45
Tabela 7- Valores da constante aparente e do TOF das reações estudadas com diferentes concentrações de agente redutor.....	47
Tabela 8 – Redução de vários substratos utilizado como catalisador 1% AuNPs/chá 1. ^a	54
Tabela 9 - Valor máximo do comprimento de onda da banda SPR, obtido pela análise de UV-Vis, para as AgNPs sintetizadas por diferentes extratos de chá.....	72
Tabela 10 - Cálculo do número de nanopartículas formadas e do número de átomos de Ag à superfície de cada nanopartícula, para AgNPs produzidas por diferentes extratos de chá e pelos diferentes métodos sintéticos.....	80
Tabela 11 - Valores de k_{app} e de conversão para a redução do 4-NF com AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá, pelo método simples.....	84
Tabela 12 - Valores de k_{app} e de conversão para a redução do 4-NF com AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá pelo método MW.....	86
Tabela 13 - Valores de k_{app} e de conversão para a redução do 4-NF com AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá pelo método US.....	87
Tabela 14 - Redução do 4-NF catalisada por AgNPs.....	92
Tabela 15 – Designação a utilizar para os diferentes extratos de chá utilizados.....	109

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Redução do 4-nitrofenol (4-NF) a 4-aminofenol (4-AF) via os intermediários <i>p</i> -nitrosofenol (1) e <i>p</i> -(hidroxiamino)fenol (2).	35
Esquema 2 – Esquema reacional da redução do 4-nitrofenol a 4-aminofenol.	36
Esquema 3 – Redução do 4-nitrofenol (4-NF) a 4-aminofenol (4-AF) por NaBH ₄ catalisado por AgNPs.	81
Esquema 4 – Esquema reacional da condensação de Knoevenagel do malononitrilo com os aldeídos aromáticos estudados.	97
Esquema 5 – Esquema reacional genérico da redução dos compostos nitroaromáticos, na presença de nanopartículas, utilizando como agente redutor o NaBH ₄ , à temperatura ambiente.	116

I – INTRODUÇÃO

I.1– NANOPARTÍCULAS

O termo nanopartícula refere-se normalmente a partículas com tamanhos até 100 nm. Estas partículas são muito menores do que os objetos com que se lida no quotidiano, que são descritos pela lei do movimento desenvolvido por Newton. No entanto, são maiores do que átomos ou moléculas simples que são regidos pela mecânica quântica. Assim, as nanopartículas metálicas, encontram-se numa categoria intermédia onde as suas propriedades não são idênticas às dos metais, nem às dos compostos moleculares.¹

As nanopartículas metálicas apresentam propriedades físico-químicas distintas e estas variam consoante a sua dimensão e distribuição. Podem também exibir diferentes morfologias (flocos, esferas, formas dendríticas, etc.) dependendo do seu método de preparação.¹

Recentemente este tipo de nanomateriais têm despertado grande interesse, devido ao largo espectro de aplicação em diversas áreas como as ciências biomédicas, os cosméticos, a indústria alimentar e química, a saúde ambiental, os dispositivos óticos, a eletrónica, em estudos catalíticos, nos emissores de luz não-lineares e em aplicações fotoeletroquímicas.²⁻⁸

A primeira referência a nanopartículas, nomeadamente de ouro não visíveis ao olho humano foi reportada por Kunchel no século XVII (1676). No entanto só no século XIX (1857) é que Faraday reportou a síntese de ouro coloidal (Figura 1). Desde o trabalho pioneiro de Faraday, têm sido publicados milhares de trabalhos científicos sobre a síntese e propriedades de nanopartículas metálicas, utilizando uma grande variedade de solventes e substratos. Na última década, os coloides de ouro têm sido o tema de um considerável e crescente número de livros e artigos. O tema tem sido intensivamente investigado e apresenta-se bastante atual, pelo que a maioria das referências reportadas neste trabalho apareceram no século XXI.^{1,6}

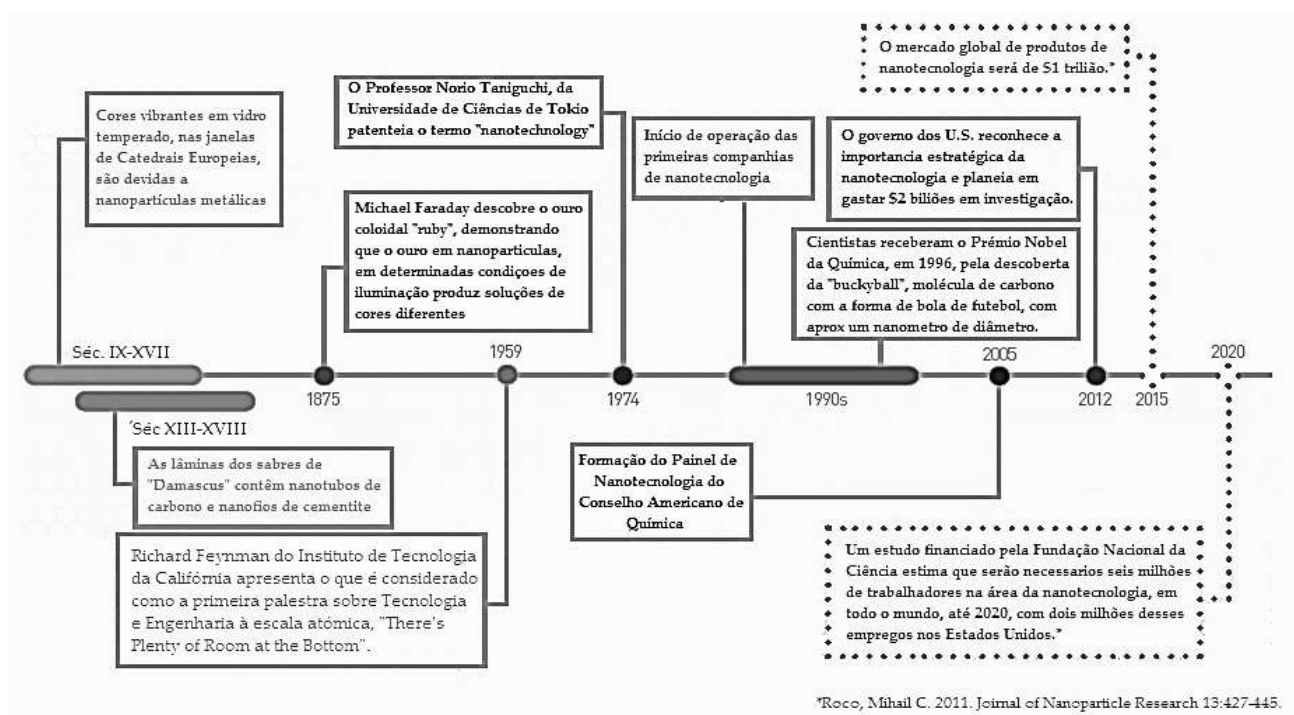


Figura 1 - Cronograma de utilização e descoberta de nanomateriais.⁹

I.2 – PROPRIEDADES DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas possuem propriedades específicas que podem ser muito atrativas para aplicações em múltiplas áreas. Estas propriedades são, por exemplo, os pontos de fusão mais baixos e as áreas superficiais específicas elevadas. Em relação ao tamanho macroscópico, as nanopartículas apresentam propriedades óticas, mecânicas e magnéticas diferentes devido à sua dimensão.^{1,6}

As propriedades físicas e químicas dos nanomateriais dependem da sua composição, do tamanho e forma da partícula^{10,11}, além da distância interpartículas, da natureza da camada superficial orgânica (*shell*) e da estrutura da banda eletrônica.^{1,3,6}

As propriedades óticas que as nanopartículas possuem são um dos seus grandes atrativos e estas são dependentes de um fenómeno designado por ressonância de plasmão.

I.2.1– PROPRIEDADES ÓTICAS DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

O fenómeno físico da ressonância do plasmão de superfície (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) foi relatado por Wood¹², que não só descobriu o fenómeno, mas também concluiu que muda com a composição do líquido em contacto com a superfície metálica. O primeiro tratamento teórico deste fenómeno foi apresentado em 1907, mas só em 1968, Otto¹³, Kretschmann e Raether¹⁴, relataram a excitação da banda de superfície do plasmão e assim completaram a teoria iniciada 60 anos antes.¹

A ressonância do plasmão está associada com a excitação coletiva de eletrões de condução e encontra-se localizada na região do visível ao infravermelho, dependendo do tamanho da partícula, forma e estrutura.⁷

Na física do estado sólido, o plasmão representa a oscilação coletiva de uma carga livre do metal, que pode ser considerada como uma espécie de onda de plasmão. A carga positiva do metal é fixa e o eletrão é libertado para se mover em torno dela. Quando aplicada uma fonte de luz, esta faz com que os eletrões livres na superfície do metal vibrem em conjunto, dando origem a plasmões de superfície. Como os eletrões também são partículas com uma carga elétrica, quando estes vibram também geram um campo elétrico. Quando o campo elétrico formado a partir da vibração dos eletrões livres e o campo elétrico externo aplicado (por exemplo, ondas eletromagnéticas) ressoarem, o efeito resultante é referido como ressonância do plasmão que ocorre na superfície do metal (Figura 2).^{1,6}

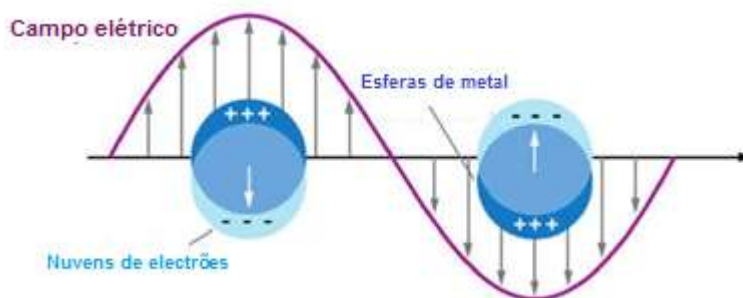


Figura 2 - Deslocalização de elétrons no efeito do plasmão de superfície.¹⁵

Outros fatores importantes na determinação da natureza da banda de ressonância do plasmão de superfície são a forma e o tamanho das nanopartículas.

Como referido, a banda SPR é dependente do material, tamanho e forma da partícula.⁷ Pode-se determinar a composição física com base em certas características associadas à sua estrutura (cristalina ou amorfa).¹ As oscilações à superfície do metal ocorrem principalmente na região do ultravioleta (UV), no entanto, no caso do ouro, prata e cobre, o plasma muda perto do domínio da luz visível. Por exemplo, o comprimento de onda do máximo da banda de ressonância do plasmão de superfície de uma nanopartícula de ouro esférica é 520-550 nm, enquanto uma solução coloidal de nanopartículas de prata apresenta uma banda de ressonância de plasmão máxima perto de 400 nm.

É possível verificar que o aumento do tamanho das nanopartículas altera esta ressonância, promovendo a alteração da posição da banda SPR para comprimentos de onda maiores, em que a energia (frequência) é menor (Figura 3, exemplo para as nanopartículas de ouro).¹

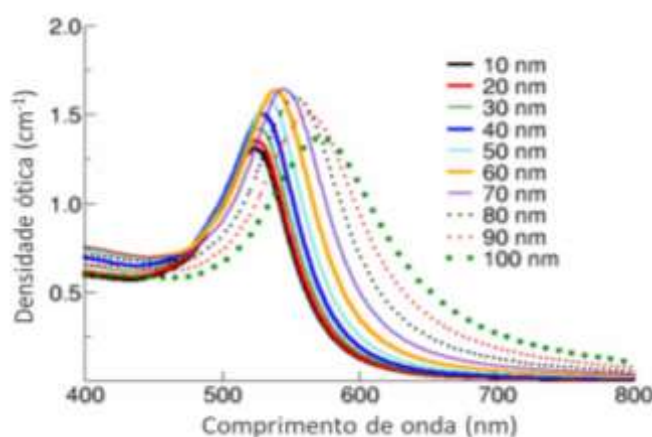


Figura 3 – Variação da banda SPR de AuNPs com diferentes tamanhos.¹⁶

Estas variações observadas para o comprimento de onda, da banda de absorção, correspondem à absorção de diferentes cores, no espectro do visível, fazendo com que as soluções apresentem cores distintas. Por exemplo, uma solução coloidal de nanopartículas de prata com o valor máximo da banda SPR perto de 400 nm absorve a cor azul da luz visível e as partículas de

prata transmitem a cor amarela (cor complementar ao azul).^{1,6} A Figura 4 apresenta diferentes exemplos de tamanhos e formatos de nanopartículas que assumem cores bem distintas. Assim, e através da banda SPR das nanopartículas é possível concluir sobre o seu tamanho e formato, pela cor que as soluções apresentam. Assim, uma vez que a banda SPR reflete as diferentes as propriedades das nanopartículas, este efeito também está relacionado com as potenciais aplicações das nanopartículas.

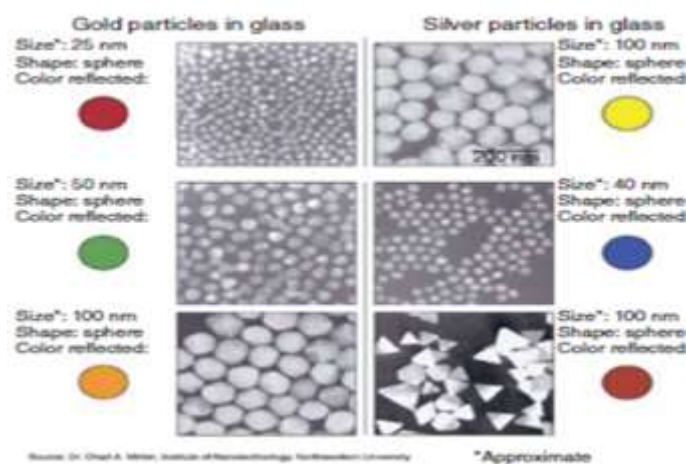


Figura 4 - Variação da cor de soluções contendo nanopartículas, de ouro e prata, com diferentes tamanhos e formas. Adap. de 1

I.3– SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

O processo de síntese de nanomateriais é muito importante pois o método deverá ser adequado, de forma a ser possível controlar as suas propriedades, tendo em conta as especificações da sua aplicação. Assim sendo, os processos ou métodos utilizados devem conseguir controlar vários parâmetros como o tamanho, distribuição, forma, estrutura cristalina e composição das nanopartículas (sem impurezas). Estes devem também proporcionar controlo da agregação, estabilização das propriedades físicas e estruturais, ter uma alta reprodutibilidade e idealmente deveram permitir a produção em massa, o *scale-up* e redução de custos de operação.¹

São conhecidas duas abordagens para a preparação de nanopartículas. Um dos métodos é conhecido por *top-down* ou *breakdown* (top-base ou destrutivo) onde uma força externa é aplicada ao sólido, levando à sua divisão em partículas pequenas. O segundo método é denominado por *build-up* ou *bottom-up*, (construtivo ou base-topo), onde se produz nanopartículas a partir de átomos de gás ou líquidos, sendo este baseado em transformações atômicas ou condensações moleculares.^{1,17,18}

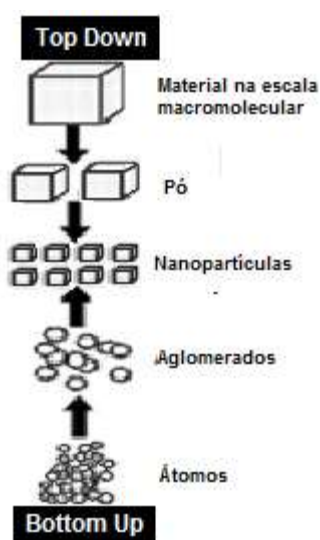


Figura 5 - Exemplo esquemático das diferenças das metodologias *Top down* e *Bottom up*, na síntese de nanopartículas. ^{Adap. de 19}

O método *top-down*, que consiste na quebra de uma substância sólida, pode ser subdividido em duas técnicas: a moagem seca e a moagem húmida. Na técnica de moagem a seco, a substância sólida é moída como resultado de um choque, compressão, ou por fricção, usando equipamentos baseados nos mais variados tipos de moinhos (moinho de martelos, de cisalhamento, rolos e outros). No entanto, para este método é difícil obter partículas com tamanhos de grão menores que 3 μm . Por outro lado a moagem húmida de um substrato sólido é efetuada usando outros tipos de moinhos como por exemplo os moinhos de esferas vibratório, moinhos planetário de esferas, moinho de pérolas de agitação. Comparado com a técnica seca, o processo por via húmida é adequado para prevenir a aglomeração das nanopartículas formadas, sendo assim possível obter nanopartículas com

elevada dispersão. Para a metodologia *top-down* também são conhecidas outras técnicas para além da moagem, tais como, técnicas mecânicas e químicas.^{1,18}

A abordagem *bottom-up* é dividida em processos na fase gasosa e na fase líquida. Para a abordagem gasosa tem-se o método de deposição de vapor químico (DVQ) que envolve uma reação química e o método de deposição física de vapor (DFV), que utiliza o arrefecimento do material evaporado. Esta metodologia permite a produção de nanopartículas de 10 a 100 nm, através de um cuidadoso controlo da reação. Realizar a reação química a altas temperaturas, pelo método DVQ, exige fontes de calor tais como chama química, processo de plasma, laser, ou um forno elétrico. No método DVF, o material sólido ou líquido é evaporado e o vapor resultante é rapidamente arrefecido, obtendo-se as nanopartículas desejadas.

Embora os métodos de fase gasosa minimizarem a ocorrência de impurezas orgânicas nas partículas formadas, quando comparados com os métodos em fase líquida, estes necessitam da utilização de equipamentos de vácuo complexos, que apresentam desvantagens como os altos custos envolvidos e baixa produtividade.^{1,18}

Os métodos de fase líquida têm sido os principais métodos de preparação de nanopartículas. Estes podem ser sub-divididos em métodos líquido-líquido e métodos de sedimentação.

Um exemplo típico do método líquido-líquido é a redução química dos iões metálicos, cuja principal vantagem é a fácil fabricação de partículas com várias formas (por exemplo, nanoprismas, nanofios, nanopratos, entre outros). Com este método é possível refinar a forma e o tamanho das nanopartículas, alterando o agente redutor, o agente de dispersão, o tempo de reação e a temperatura. O método envolve a redução química dos iões metálicos para os seus estados de oxidação zero (*i.e.*, $M^+ \rightarrow M^0$), e o processo utiliza equipamentos ou instrumentos simples podendo produzir grandes quantidades de nanopartículas a baixo custo e num curto período de tempo. A utilização de radiação microondas como a fonte de calor pode produzir nanopartículas de alta qualidade num curto período de tempo.^{1,3}

Além do método de redução química em que se adiciona um agente de redução (método de redução direta), são conhecidos outros métodos de redução, tais como a foto-redução (utilizando raios gama), sonoquímica e de plasma líquido que podem ser utilizados para sintetizar nanopartículas. Estes métodos alternativos, que não utilizam uma substância química redutora, têm o atrativo de não adicionarem impurezas externas às nanopartículas. Para além destes são conhecidos outros métodos como a secagem por pulverização, pirólise de pulverização, síntese solvotérmica e o método supercrítico.¹

A técnica geral dos métodos de sedimentação é um processo sol-gel, que tem sido extensivamente utilizado para o fabrico de nanopartículas de óxidos de metais. Este procedimento transforma uma solução de um alcóxido de metal numa solução coloidal por meio de hidrólise, seguida por policondensação de um gel. O processo de impregnação (método de fase líquida) garante uma alta dispersividade das nanopartículas em comparação com o método seco. No entanto, se as nanopartículas resultantes forem secas, rapidamente se inicia a sua agregação. Neste caso, a re-dispersão poderá ser efetuada de acordo com o processo utilizado no método de fase sólida.¹

Em certos casos pode haver a necessidade de separar partículas com tamanho desejado, a partir de uma solução coloidal que contém vários tamanhos. Assim, existem métodos para efetuar

esta separação, nomeadamente utilizando técnicas como precipitação, separação por centrifugação, coluna de filtração em gel ou electroforese em gel.¹

Para a abordagem *bottom-up*, que é a abordagem mais utilizada nos principais métodos de preparação de nanopartículas, existem várias etapas, durante a formação das nanopartículas. Estas etapas são: (i) geração de átomos; (ii) nucleação para formar um aglomerado inicial de átomos (*cluster*); (iii) crescimento do aglomerado até atingir um determinado volume; e (iv) adição de um agente de proteção em torno do aglomerado que impede uma aglomeração maior do que a desejada (Figura 6). Após o seu crescimento para o tamanho desejado, será sempre necessário estabilizar a superfície das partículas por adição de um agente dispersante. As nanopartículas devem ser formadas na presença de um agente de proteção, que pode envolver compostos como alcanotóis, aminas, nucleotídeos e polímeros, a fim de evitar a agregação das nanopartículas, resultantes das forças de atracção de Van der Waals (Figura 7).^{3,23} Estes agentes promovem uma camada protetora sobre as nanopartículas, que permite uma maior estabilidade das nanopartículas em solução.²⁰ De notar que se o tamanho das nanopartículas diminui (isto é, se há um aumento da área superficial específica), então o aumento da energia superficial das nanopartículas vai facilitar a sua agregação. Quando a concentração de nanopartículas é invulgarmente elevada, a ação estabilizadora do agente protetor pode já não ser suficientemente forte para evitar a agregação.¹

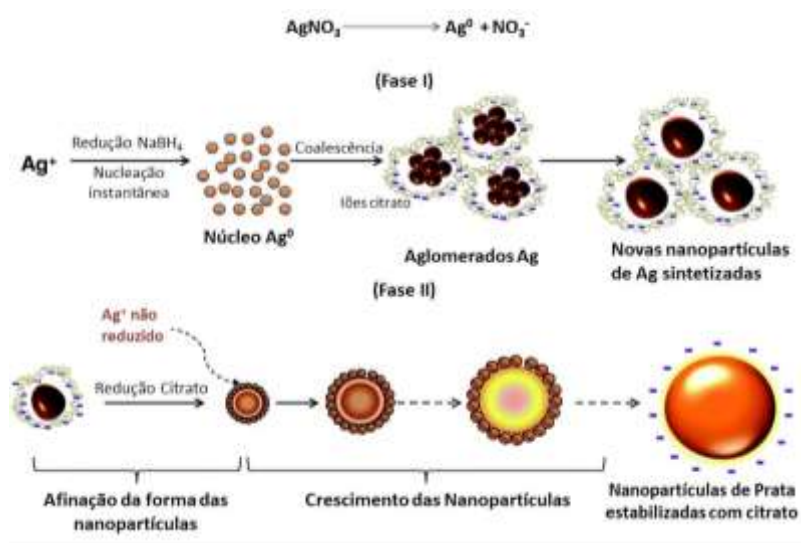


Figura 6 - Esquema da síntese de nanopartículas de prata, por redução com borohidreto de sódio e estabilização com citrato. Adap. de 21

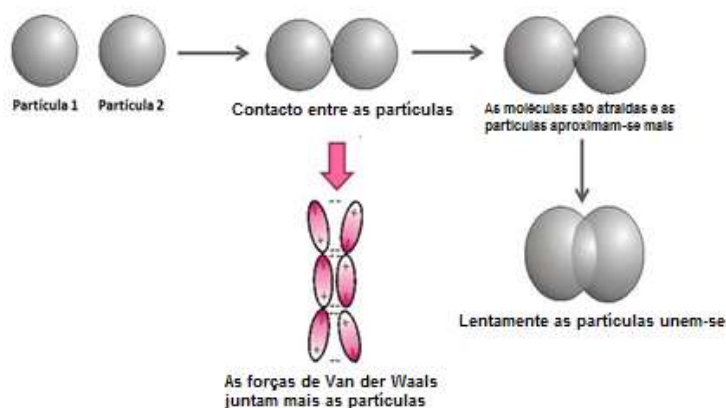


Figura 7 - Representação das forças de Van der Waals, na agregação de partículas. ^{Adap. de 22.}

I.3.1– NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) ou colóides de ouro são as nanopartículas metálicas mais estáveis e que apresentam características muito interessantes que permitem a sua utilização em várias aplicações. A sua síntese pode ser efetuada por vários métodos, mas tal como a maioria das vias de produção de nanopartículas utiliza-se maioritariamente a abordagem *bottom-up*.^{6,23}

Os métodos convencionais de síntese de AuNPs, são efetuados por intermédio da redução de derivados do ouro(III), onde o mais utilizado tem sido a redução com citrato de HAuCl_4 em água. Atualmente é possível controlar o tamanho das nanopartículas formadas a partir do rácio entre o agente redutor/estabilizante e o substrato. Além do tamanho, também a forma pode ser controlada, através da monitorização dos parâmetros reacionais.⁶

Como métodos menos convencionais, utilizam-se técnicas fotoquímicas (radiação UV e infravermelhos), sonoquímicas (aplicação de ultrassons), microondas, laser e decomposição térmica.⁶ As vantagens que estes métodos apresentam são a simplicidade, menores custos e o facto de serem técnicas “amigas do ambiente”. Para alguns casos existe ainda a vantagem de utilizarem equipamentos facilmente disponíveis e a possibilidade de se obterem partículas com elevada seletividade de tamanho e pureza.²⁴

I.3.2– NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para a síntese e estabilização das nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido utilizados vários métodos químicos e físicos. As abordagens químicas mais comuns incluem a redução química, utilizando uma variedade de agentes redutores orgânicos e inorgânicos, técnicas eletroquímicas e reduções físico-químicas. A maioria destes métodos está ainda em fase de desenvolvimento devido a problemas com a reatividade, agregação das nanopartículas, controlo do crescimento do cristal formado, morfologia, tamanho e distribuição de tamanho.²

A abordagem mais comum para a síntese de AgNPs também é a redução. São utilizados diferentes agentes redutores, tais como citrato de sódio, boro-hidreto de sódio (NaBH_4),²¹ *N,N*-dimetilformamida (DMF)², entre outros. A presença de agentes estabilizantes (por exemplo, tióis, aminas, ácidos e álcoois) nas soluções contendo NPs, oferecem a possibilidade de estabilizar o crescimento das mesmas, protegendo-as da aglomeração e mantendo as suas propriedades superficiais.²

Como abordagens físicas, as mais importantes são a evaporação-condensação e ablação por laser. Estes métodos têm como vantagens a ausência de contaminação por parte do solvente e a uniformidade da distribuição das NPs.²

I.4– SÍNTESE “VERDE” DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

As nanopartículas (NPs) metálicas são normalmente sintetizadas utilizando métodos químicos que envolvem uma reação de redução por agentes redutores orgânicos ou inorgânicos, que podem em simultâneo atuar como agentes estabilizantes de forma a evitar a agregação das NPs (como a hidrazina, borohidreto de sódio ou a *N,N*-dimetilformamida). Atualmente sabe-se que estes químicos estão associados a riscos ambientais e de toxicidade, o que leva a um crescente interesse no desenvolvimento de estratégias de síntese, que possam envolver métodos menos agressivos para o ambiente e ao mesmo tempo sejam sustentáveis, para a preparação de várias nanopartículas metálicas, com tamanhos e características específicas.^{2,18,20}

Os processos "verdes" idealmente seriam realizados à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, em meio aquoso ou em condições livres de solvente e utilizando compostos “amigos do ambiente” como agentes redutores. Assim, a escolha do solvente, de agentes redutores e estabilizantes não tóxicos e “amigos do ambiente” são questões importantes a considerar na síntese “verde” de nanopartículas. Para o desenvolvimento de técnicas “verdes” e mais sustentáveis é necessário desenvolver sinergias entre a nanotecnologia e a natureza. Assim, estes processos de síntese “verde” muitas vezes envolvem microorganismos e produtos naturais.^{2,20,25-31}

Um componente natural que tem atraído grande atenção, no meio científico, devido aos benefícios para a saúde, é o chá. A nanotecnologia “verde” desenvolvida utilizando extratos de chá, frutos ou verduras tem como base os fitoquímicos presentes nestes produtos que são antioxidantes poderosos, e que por isso possibilitam a produção de nanopartículas biocompatíveis que atualmente

são testadas em diversas áreas, como a saúde e a energia. Estes fitoquímicos presentes no chá têm a dupla função de agente redutor do metal e também de estabilizador, num só passo.^{27,32,33}

Os extratos aquosos de chá são conhecidos pelo seu elevado teor em flavonóides e compostos fenólicos, pelo que no presente trabalho estes foram escolhidos para atuar como um agente redutor e estabilizante “verde” e de baixo custo para a síntese de diferentes NPs metálicas. Na natureza, os polifenóis são dos compostos mais importantes em diversas reações biológicas de redução muito frequentes em plantas e animais. Os flavonóides atuam como antioxidantes pois têm a capacidade de doar átomos de hidrogénio. O hidroxifenol e seus derivados podem ser utilizados com agentes redutores versáteis para sínteses simples de nanopartículas com diferentes morfologias.³⁴

Assim, uma vantagem deste método é a possibilidade de controlo do tamanho das NPs, variando a concentração da solução de chá utilizada na sua preparação. Para além disso, é possível alterar a forma das NPs, alterando a concentração da solução do agente redutor e/ou o rácio do sal metálico.³⁵

I.5– APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS

As NPs metálicas, e em especial as que derivam de óxidos metálicos, são atualmente utilizadas como aditivos de combustíveis de modo a diminuir as emissões de gases poluentes (CO_2 e CO) aumentando a eficiência de combustão.³⁶ Devido à sua elevada área superficial, também estão a ser investigadas para o desenvolvimento e produção de eletricidade solar fotovoltaica.^{37,38}

As NPs também podem ser utilizadas para produzir um catalisador ativo com elevada seletividade (por exemplo, nanopartículas de ouro) fazendo com que a eficiência de certas reações seja reforçada.¹

A versatilidade das NPs de ouro e prata em campos como a catálise, os biossensores, a fotônica, sistemas de “*drugdelivery*”, agentes antimicrobiais em ensaios imunitários, ensaios clínicos, detecção e fototermólise de microorganismos e células cancerígenas, além de “*bioimaging*” torna-as as mais estudadas até à data. Estas nanopartículas têm sido propostas para utilização em praticamente todas as etapas médicas, incluindo o diagnóstico, a terapia e a profilaxia, e também em higiene (por exemplo, purificação de águas residuais). As nanopartículas de ouro produzidas a partir de extratos vegetais também têm sido utilizadas em tintas antibacterianas.^{3-8,23,39}

As nanopartículas de prata apresentam especial interesse devido à sua ampla gama de aplicações antibacterianas⁴⁰, em biossensores⁴¹ (detecção de bactérias) ou para atividades anticancerígenas⁴². Estas possuem aplicações como catalisador, sensores óticos, engenharia têxtil, eletrônica, ótica e mais importante, no campo da medicina com aplicações antibacterianas e como agente terapêutico. Estas nanopartículas podem ser utilizadas em componentes eletrônicos devido às propriedades eletroquímicas das nanopartículas de prata, incorporadas em produtos cosméticos e têxteis, fibras compósitas e materiais supercondutores criogénicos.^{2,43} Contudo, as AgNPs têm uma maior propensão para desenvolver corrosão e agregação, pelo que o seu uso é mais limitado, comparativamente com o ouro, especialmente em aplicações biológicas, embora tenha sido provado que a prata em pequenas quantidades não é tóxica.^{20,44,45}

I.5.1– APLICAÇÃO EM CATÁLISE

As nanopartículas têm apresentado grande interesse em aplicações catalíticas, por apresentarem atividades maiores. Têm sido utilizadas para catalisar reações de oxidação, especificamente oxidação da glicose, oxidação aeróbica de álcoois, oxidação do CO e epoxidação do propileno.^{46,47}

Na área da catálise heterogénea, têm sido utilizados uma grande variedade de óxidos e sulfuretos de metal em sínteses químicas inorgânicas, como catalisadores. Os catalisadores metálicos, no geral, são amplamente usados numa variedade de reações, incluindo a hidrogenação, oxidação completa e parcial, e redução de NOx com hidrocarbonetos. Os catalisadores são geralmente dispersos como pequenas partículas suportadas em óxidos de metal estáveis, tais como Al_2O_3 e SiO_2 . Na verdade, os elementos que são utilizados como catalisadores metálicos são apenas 12 e pertencem aos grupos 8, 9, 10 e 11 da Tabela Periódica. Os mais utilizados são o ferro, cobalto,

níquel e cobre (metais 3d), o ródio, paládio e prata, (metais 4d) e platina (metal 5d). O ouro (5d) tem sido a única exceção desta lista, uma vez que foi considerado quase como inativo como um catalisador. No entanto, quando o ouro é utilizado como nanopartículas com diâmetros inferiores a 10 nm e é disperso em suportes cerâmicos, passa a ser um catalisador altamente ativo para muitas reações, tais como a oxidação de CO e álcoois^{1,48}, reações de acoplamento,⁴⁹ síntese do cloreto de vinilo⁵⁰, e de epoxidação do propileno na fase gasosa.⁵¹ Na forma de nanopartículas, tanto as características catalíticas e de adsorção da superfície do ouro aumentam. Assim, a ação catalítica é mais rápida quanto menor for o tamanho das nanopartículas.^{6,47,52}

I.5.1.1– Reações de Redução

Tal como para vários outros tipos de reação, as reações de redução têm sido bastante investigadas, com a utilização das nanopartículas como catalisador.¹

Entre as reações de transição redox catalisadas por metais, a redução de composto nitroaromáticos é uma das mais importantes. A redução do 4-nitrofenol tem interesse em ser desenvolvida, pois este é um conhecido subproduto de pesticidas, herbicidas e da indústria dos corantes sintéticos e o seu produto de redução, o 4-aminofenol, é um composto bem menos poluente e mais “amigo do ambiente”, para além de ser um precursor de medicamentos analgésicos e antipiréticos e é um intermediário do paracetamol.^{52,53,54}

Estas reações foram escolhidas por serem reações modelo, através das quais é possível examinar a performance catalítica das nanopartículas em estudo. São consideradas reações modelo, pois apresentam características que permitem a facilidade de interpretação dos resultados obtidos e de percepção do decorrer da reação, como o facto de poderem ser monitorizadas por espectroscopia de UV-Vis, pois possuem bandas de absorção bem definidas para os substratos, intermediários e produtos da reação. No entanto estas têm de ser realizadas em condições suaves (temperatura ambiente, utilizando solventes como a água). As reações modelo permitem avaliar eficiência de diferentes NPs, sendo muito úteis, inclusivamente, para concluir sobre parâmetros ótimos destas.⁵⁵

I.5.1.2– Degradação de Pigmentos

As águas residuais de processos industriais contêm vários compostos que são tóxicos e não permitem tratamento biológico direto. Os pigmentos são o maior poluente e contaminante das águas. Estes pigmentos são quimicamente estáveis e não são biodegradáveis na água, o que faz deles potencialmente prejudiciais para o ambiente. Uma das maiores preocupações ambientais com pigmentos é a sua absorção e reflexão da luz solar ao entrar na água, que pode causar interferências no crescimento de bactérias. Os poluentes, uma vez libertados no ecossistema aquático podem causar vários problemas ambientais, pelo que é necessário tentar desenvolver técnicas para a redução da concentração destes, antes de serem libertados para o meio ambiente. Assim, com vista a amenizar estes problemas, surge neste trabalho a tentativa de aplicação de nanopartículas, na remoção destes compostos.^{56,57}

I.5.1.3– Reações de Condensação

A reação de condensação de Knoevenagel é uma modificação da condensação aldólica. Esta consiste na reação entre um composto carbonílico e outro contendo o grupo metileno ativado, resultando na formação do aduto com uma ligação dupla carbono-carbono.

Esta reação é um dos métodos mais importantes e mais vastamente empregues para a formação de ligações carbono-carbono. Tem aplicação na preparação de vários alcenos substituídos e na síntese de intermediários como derivados de cumarinas utilizadas em perfumes, cosméticos e compostos bioativos. Devido à sua importância para a indústria farmacêutica têm sido reportadas várias metodologias e técnicas para a elaboração desta reação.^{58,59} Assim, com este trabalho pretende-se estudar a atividade das nanopartículas nesta reação, de modo a ser possível obter uma metodologia mais “verde”, eficiente e “amiga do ambiente”, para esta importante reação.

I.5.2– APLICAÇÃO EM ESTUDOS BIOLÓGICOS

Como referido anteriormente, as nanopartículas, nomeadamente as de ouro e de prata, têm suscitado um grande interesse em aplicações médicas, antimicrobianas e como biossensores, devido às suas únicas e atrativas propriedades.⁶⁰ A ligação de nanopartículas e biomoléculas têm ganho muita atenção quer industrial, quer a nível académico, uma vez que esta combinação pode criar novos materiais para várias aplicações biotecnológicas.⁶¹

I.5.2.1– Interações com o ADN

A interação de NPs metálicas com ácidos nucleicos é muito estudada no campo da bioinorgânica devido a possíveis efeitos na síntese, replicação e na estrutura do ADN e do RNA.⁶² Por esta razão, os compostos com capacidade para interagir com o ADN possuem elevado potencial como agentes quimioterapêuticos, podendo suprimir a replicação ou transcrição de genes de células cancerígenas. Deste modo, um dos grandes desafios para os investigadores de nanobiotecnologia tem sido a conceção de moléculas que se liguem ao ADN seletivamente, com constantes de associação elevadas.⁶³

O ADN é uma molécula biológica que possui vários locais de ligação disponíveis para outros compostos. Deste modo, os compostos químicos podem interagir com o ADN por ligação aos sulcos (cavidades), intercalação ou por ligação externa por interações eletrostáticas atrativas.^{63,64} É sabido que o brometo de etídio (BE) se liga ao ADN por intercalação e o Hoechst 33258 é um exemplo de um composto que se liga pelos sulcos (*groove binding*) (Figura 8). A interação entre os compostos e o ADN é normalmente iniciada por transferência hidrofóbica de um ligando lipofílico do ADN da solução

aquosa polar para um ambiente menos polar do ADN. De notar que em vários casos os 3 modos de ligação podem ocorrer simultaneamente.⁶³

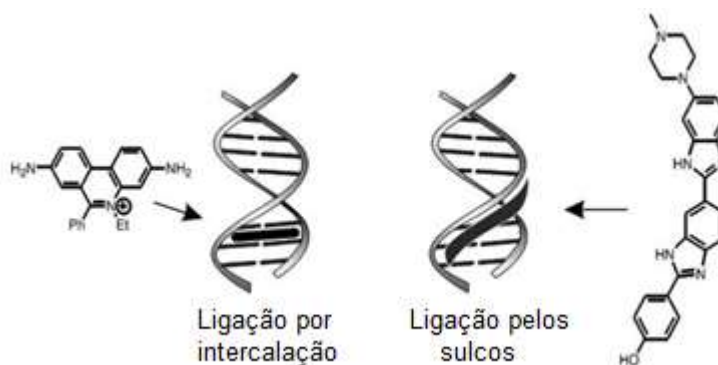


Figura 8 - Diferentes modos de ligação ao ADN, verificada para dois compostos distintos (brometo de etídio à esquerda e o Hoechst 33258 à direita)⁶³

É sabido que as propriedades físicas do ADN se alteram quando este se liga a outros compostos químicos, formando complexos de associação, podendo inclusivamente provocar alterações na forma de hélice. As formas conhecidas do ADN são três, a A, B e Z, sendo a B a mais comum (Figura 9).

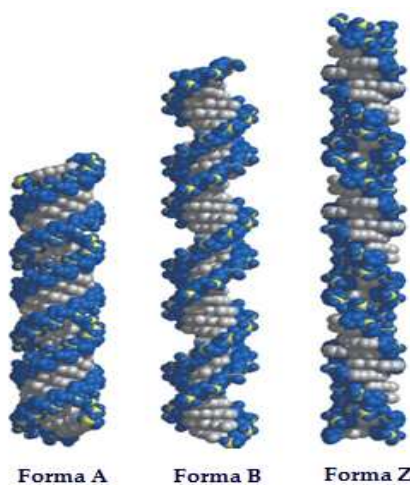


Figura 9 – Formas conhecidas adoptadas pela hélice do ADN. ^{Adapt. de 65}

Assim, uma vez que as propriedades físicas dos complexos formados são distintas das do ADN, o seu estudo pode ser muito útil na avaliação do processo de interação, permitindo a confirmação do modo de ligação e a sua extensão.

As propriedades do complexo formado podem ser avaliadas através da medição da sua viscosidade, temperatura de fusão e propriedades de absorção e emissão. Para a análise destas últimas, pode-se recorrer a técnicas de espectroscopia de UV-Vis, de fluorescência e dicroísmo circular e linear. De referir que muitas vezes só a combinação de métodos permite obter informação suficiente para concluir sobre o modo de ligação do composto químico ao ADN.⁶³

I.5.2.2– Interações com proteínas

As proteínas são constituídas por sequências de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, onde cada molécula apresenta uma sequência bem definida de aminoácidos. Os diferentes aminoácidos e a sua combinação na molécula são responsáveis pela diversidade funcional e consequentes propriedades das proteínas. Em condições fisiológicas, a cadeia de aminoácidos enrola-se espontaneamente, adquirindo uma estrutura tridimensional. De modo a desempenharem as suas funções biológicas, as proteínas sofrem modificações enzimáticas ou químicas, durante ou após a sua síntese. Estas modificações são muito importantes para compreender a estrutura das proteínas e a relação estrutura/função. Normalmente existe apenas uma conformação (arranjo tridimensional energeticamente estável) para a qual a proteína mantém a atividade biológica (conformação nativa).⁶⁶

As interações entre compostos químicos e as proteínas têm importantes implicações em determinados processos biológicos. As interações podem resultar na formação de complexos estáveis (agregados) que podem ter efeitos significativos na distribuição da concentração livre e atividade biológica.⁶⁷

A análise da estrutura das proteínas apresenta quatro níveis distintos, estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 10).

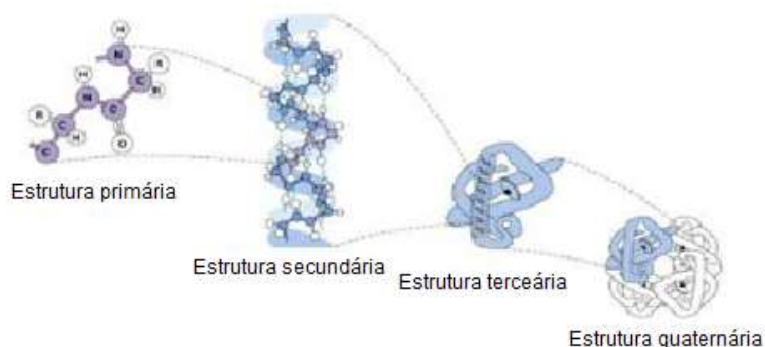


Figura 10 - Representação esquemática das várias estruturas das proteínas⁶⁸

A albumina do soro é uma das proteínas mais estudadas. Corresponde à proteína mais abundante no plasma do sangue e as suas funções estão associadas à ligação, transporte, armazenagem e metabolização de muitas moléculas.^{69,70}

Das albuminas comerciais, a albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) é a mais utilizada em estudos biológicos, devido à sua estabilidade, custo reduzido e semelhança com a estrutura da albumina do soro humano (HSA).⁷⁰

Estudos efetuados sobre a caracterização da estrutura das albuminas determinaram as regiões preferenciais de ligações de fármacos. A albumina do soro bovino é constituída por 582 aminoácidos e apresenta dois resíduos de triptofano denominados por Trp-134 e Trp-212 (Figura 12).⁷⁰

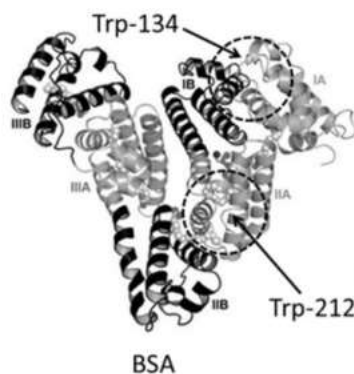


Figura 11 – Estrutura da albumina do soro bovino. ^{Adapt. de 70}

De modo a monitorizar a eficiência do metabolismo de fármacos no organismo é estudada a extinção da fluorescência das proteínas, que é consequência da presença de determinados compostos químicos. A albumina do soro bovino, excitada a 280 nm, apresenta fluorescência a um comprimento de onda máximo de 350 nm, devido a compostos como os L-aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. Dos resíduos presentes nesta molécula, a emissão dos resíduos de triptofano da BSA (Trp-134 e Trp-212) é a mais significativa, devido ao ambiente que em que se encontram inseridos. A principal vantagem desta técnica é a elevada sensibilidade a mudanças no ambiente, na estrutura das proteínas e nas membranas celulares.⁷⁰

II – RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.1 – EXTRATOS DE CHÁ

O estudo efetuado teve como objetivo a utilização de diferentes extratos de chá na síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs), na qual os compostos fenólicos e flavonóides presentes nesses extratos atuam como agentes redutores e agentes estabilizantes. Assim, ao longo do trabalho foram aplicados diferentes tipos de chá, de forma a concluir sobre o seu efeito nas características das nanopartículas (NPs) produzidas e consequentemente na posterior aplicação em diferentes sistemas catalíticos. Foram utilizados 6 tipos de chá e misturas de chás, nomeadamente o chá preto da Tetley, o chá verde da Gorreana, o chá rooibos da Royal T-sick, a mistura de chá vermelho/fibras/ameixa e hibisco da Cem Porcento (comercializada com a designação "Peso Ideal"), a mistura de cavalinha/alcachofra/pilriteiro e urtiga verde da marca Pura vida (comercializada com a designação "Peso Ideal") e a mistura de dois chás pretos, Kenyan e Rwandan, da marca Marks & Spencer (comercializada com a designação "Christmas tea"). Para além destes extratos de chá, foram também testados extratos de bagas Goji, na preparação de NPs.

A substituição de redutores químicos (ex.: NaBH_4) usualmente utilizados na redução de sais metálicos a NPs, por redutores naturais presentes em extratos de plantas constitui um passo muito importante na produção "verde" e ecológica de NPs. A presença destes agentes redutores naturais presentes nos extratos de chá foi confirmada através da realização de testes bioquímicos. Estes testes são apenas qualitativos, pelo que não é possível retirar qualquer informação quantitativa sobre estes compostos. A influência dos extratos na produção de NPs será discutida posteriormente, na sua caracterização e nas aplicações em catálise.

Tabela 1 – Designação a utilizar para os diferentes extratos de chá utilizados.

Extrato de chá	Designação
Tetley	Chá 1
"Christmas"	Chá 2
Verde	Chá 3
Rooibos	Chá 4
Peso ideal	Chá 5
Drenagem	Chá 6

II.1.1– TESTES DE DETECÇÃO DE COMPOSTOS

II.1.1.1– Detecção de Flavonóides

Para a detecção de flavonóides adicionou-se 5 mL de uma solução diluída de amónia a 2 mL do extrato de chá e posteriormente várias gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento da cor amarela confirma a presença de flavonóides. De notar que, a adição da solução de amónia, para alguns extratos de chá, provoca uma mudança de cor mais acentuada, sendo mais fácil detetar a presença de flavonóides, quando retoma a tonalidade amarela indicativa destes compostos (exemplo na Figura 13)⁷¹.

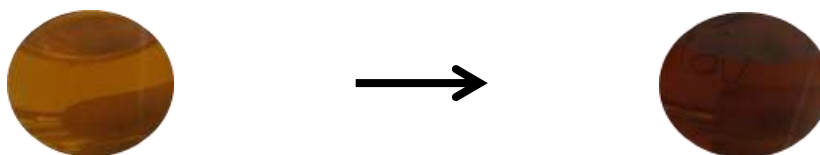


Figura 12 - Exemplo da mudança de cor de um extrato de chá (**chá 1**), aquando a adição da solução de amónia, para a confirmação da presença de flavonóides.

II.1.1.2– Detecção de compostos fenólicos

Para confirmar a presença de compostos fenólicos no chá, foram adicionadas várias gotas de cloreto de ferro(II) 5 % a 2 mL de extrato de chá. O aparecimento da cor verde-escuro indica a presença de compostos fenólicos.

Estes testes bioquímicos de detecção de flavonóides e compostos fenólicos foram efetuados para os diferentes extratos de chá e bagas Goji, estudados ao longo deste trabalho. Na Tabela 2 estão representados os resultados destes testes para todos os extratos referidos anteriormente, com uma concentração de 1%. A Tabela 3 apresenta os resultados para os estudos efetuados aos chás **1** e **2** (chá Tetley e “Christmas”) e para o extrato de bagas Goji com uma concentração de 10%.

Foi verificado que os extratos a 1% dos **chás 1** e **2**, necessitaram apenas da adição de 400 µL da solução de ácido sulfúrico, para retomarem a cor amarela. Os **chás 3** e **4** (extratos de chá verde e roibos), também apresentaram resultados positivos, para a presença de ambos os compostos. Para os **chás 5** e **6** (extratos de chá “drenagem” e “peso ideal”), no teste efetuado para a detecção dos compostos fenólicos, verificou-se o aparecimento de um tom mais escuro, embora não tão acentuado quanto o verificado para outros. Para o teste de detecção dos flavonóides, estes mesmos extratos apresentam uma tonalidade diferente da original, tomando uma ligeira tonalidade amarela, podendo-se confirmar a presença destes compostos.

Tabela 2 – Resultados dos estudos bioquímicos efetuados para diferentes extratos de chá 1 %.

















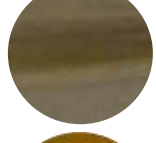

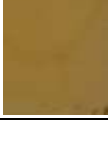


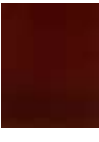



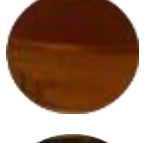

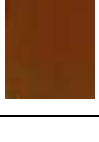


Chá	Extratos	Deteção de flavonóides	Deteção de compostos fenólicos
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Bagas Goji			

Tabela 3 – Resultados dos estudos bioquímicos efetuados para diferentes extratos de chá 10 %.

Chá	Extratos	Deteção de flavonóides	Deteção de compostos fenólicos
1			
2			
Bagas Goji			

Nos testes realizados utilizando os extratos mais concentrados (10%) verificou-se que para os extratos de chá Tetley e “Christmas tea” foram necessários ca. 2 e 9 mL, respetivamente, para obtenção da coloração amarela, o que está de acordo com o maior teor de compostos fenólicos esperado.

Para os extratos de bagas Goji 1 e 10% não se observou a cor específica indicadora da presença de compostos fenólicos. No teste aos flavonóides, a solução de Goji 1% passou a apresentar uma tonalidade amarela, indiciando a presença de flavonóides, enquanto a solução 10% ficou mais escura com a adição da solução de amónia, mas não apresentou a tonalidade amarela esperada. A mudança de cor na presença de amónia, não foi tao visível para estes extratos, como para os anteriores. De facto estudos anteriores⁷² indicam que estas bagas apresentam aminoácidos e polissacáridos na sua composição, mas não referem a presença de compostos fenólicos, nem de flavonóides.

II.2– NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNPs)

II.2.1– SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Para a preparação das AuNPs, foram escolhidos dois tipos de chá, o chá preto da Tetley (**chá 1**) e o “*Christmas tea*” (**chá 2**). Contudo, o chá utilizado preferencialmente foi o **chá 1**, por ser mais acessível, enquanto o **chá 2**, foi utilizado com o intuito de concluir sobre o efeito de diferentes extratos de chás nos estudos realizados.

A preparação das AuNPs, por síntese verde utilizando extratos de chá, foi efetuada com base no método previamente descrito⁷³. A solução de chá foi obtida após mistura das folhas de chá em água destilada, seguida de agitação vigorosa durante 15 minutos à temperatura ambiente. De modo a avaliar a influência da concentração de agentes redutores naturais presentes nos extratos de chá na síntese das AuNPs, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de extrato de chá (1, 5 ou 10% m/V) e consequentemente com diferentes quantidades de agentes redutores. Após filtração da suspensão (folhas de chá), foram transferidos 6 mL de cada uma das soluções e adicionou-se 0,1 mL de uma solução 0,1 M de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, deixando-se a agitar durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Doravante, as nanopartículas produzidas utilizando diferentes quantidades de folhas de chá serão designadas de acordo com a sua concentração e extrato de chá utilizado na sua síntese, por exemplo, nanopartículas de ouro produzidas utilizando um extrato de chá a 1% (m/V) de chá Tetley, terá a designação abreviada de 1% AuNPs/**chá 1**.

Ao longo da preparação das AuNPs observou-se ainda que a cor amarelada da solução inicial, passou a apresentar uma tonalidade diferente de acordo com a concentração de extrato utilizado, por exemplo para as 1% AuNPs a cor foi alterada do amarelo (cor do extrato de chá), para uma tonalidade vermelho/bordeaux, quase instantaneamente, indicando a redução do Au, enquanto para as 10% AuNPs, a cor que a solução passa a apresentar é uma tonalidade esverdeada.

A utilização de diferentes concentrações do extrato de chá, na síntese das AuNPs, influencia o tamanho das NPs e consequentemente a cor da solução final (Figura 14) como reportado em casos anteriores⁷³.

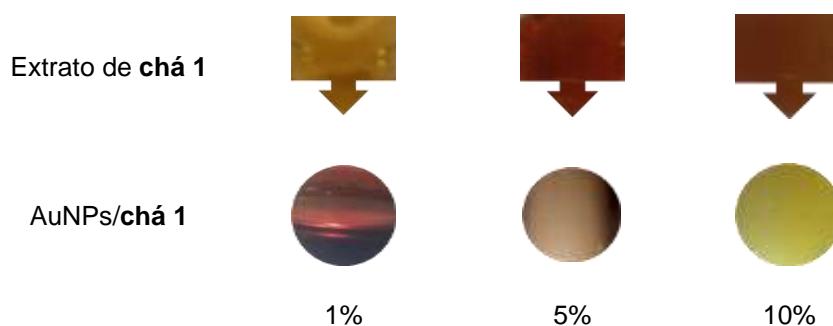


Figura 13 - Imagens do **chá 1** de diferentes concentrações, antes e após a formação de AuNPs.

II.2.2– CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNPs sintetizadas foram caracterizadas por métodos espectroscópicos nomeadamente por Espectroscopia de UV-Visível (UV-Vis) e Espectroscopia por Difração de raios-X (EDS), bem como técnicas microscópicas como a Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM), de forma a ser possível obter informação sobre a sua forma, tamanho, morfologia, dispersão e composição das amostras.

Numa fase preliminar é possível retirar conclusões acerca da formação das AuNPs e da sua dimensão através da visualização da cor da solução. Por exemplo, o aparecimento da tonalidade bordeaux indica que a banda SPR se verifica para comprimentos de onda menores e assim é possível concluir sobre a formação de AuNPs de pequena dimensão^{1,16}.

II.2.2.1– Métodos Espectroscópicos

Espectroscopia de UV-Vis

É sabido que as AuNPs apresentam uma banda a um comprimento de onda específico no espectro de UV-Vis, devido à ocorrência da banda de ressonância do plasmão de superfície (SPR). Esta banda é característica para as AuNPs, na região do visível e no intervalo de 500-600 nm, variando com o tamanho das NPs¹. Em estudos anteriores, foi reportado que a banda característica é desviada para valores de comprimento de onda mais baixos, com a diminuição do tamanho das NPs⁷⁴⁻⁷⁶. Assim, através desta técnica é possível confirmar a formação de AuNPs bem como concluir sobre o seu tamanho.

O espectro de absorção UV-Vis para as soluções de 1, 5 e 10% AuNPs segue o comportamento esperado e reportado em estudos anteriores. A banda SPR das 1% AuNPs produzidas pelo **chá 1** surge a ca. 538 nm, o que está de acordo com o menor tamanho apresentado por estas AuNPs (com diâmetro entre 10 e 20 nm), relativamente às soluções com 5 e 10% AuNPs, que apresentam bandas SPR a comprimentos de onda 566 nm e 602 nm, respectivamente, indicando que possuem tamanhos maiores (Figura 15).

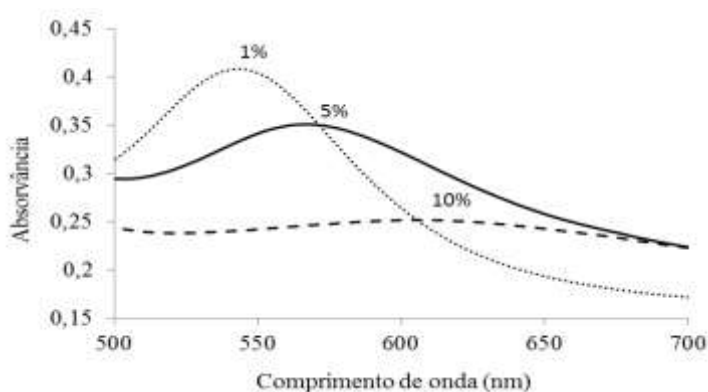


Figura 14 - Espectro de UV-Vis para as soluções 1, 5 e 10% AuNPs (sintetizadas com o **chá 1**).

Espectroscopia por Difração de Raios-X

De modo a verificar qual a estrutura cristalina das AuNPs sintetizadas, foi efetuada a análise estrutural de uma amostra, utilizando a técnica de difração de raios-X (*X-ray diffraction*, XRD), que foi comparada com a solução padrão de AuNPs (Figura 18). Para esta técnica a amostra analisada foi o extrato seco de 1% AuNPs/**chá 1**. O difratograma obtido para esta amostra revela picos característicos do ouro na estrutura cúbica de faces centradas (*Joint Committee on Powder Diffraction Standard* (JCPDS), Ficheiro No. 04-0784). Os picos característicos do ouro, correspondentes a (111), (200), (220) estão localizados respetivamente a $2\theta = 38.29^\circ$, 44.43° e 64.68° . Os resultados obtidos indicam que a amostra estudada é composta por ouro cristalino.

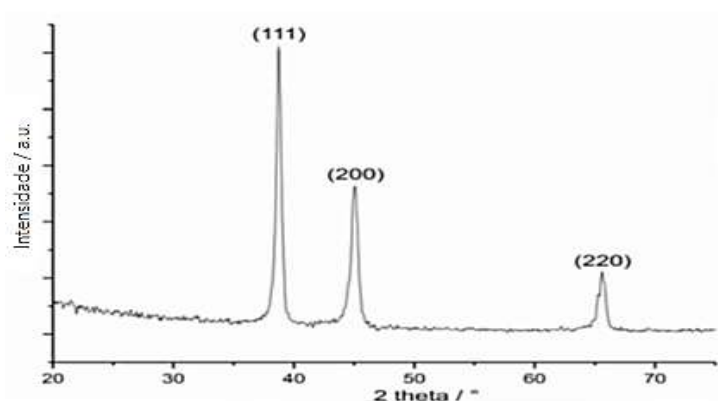


Figura 15 – Difratograma da análise XRD de uma amostra de 1% AuNPs, sintetizadas com o **chá 1**.

II.2.2.2– Métodos Microscópicos

Microscopia Eletrônica de Transmissão

A técnica TEM foi utilizada de modo a ser possível determinar a forma e o tamanho das AuNPs produzidas a partir de soluções de **chá 1** a 1% (Figura 19a) e a 10% (Figura 19b) e de **chá 2** a 1% (Figura 20a) ou 10% (Figura 20a).

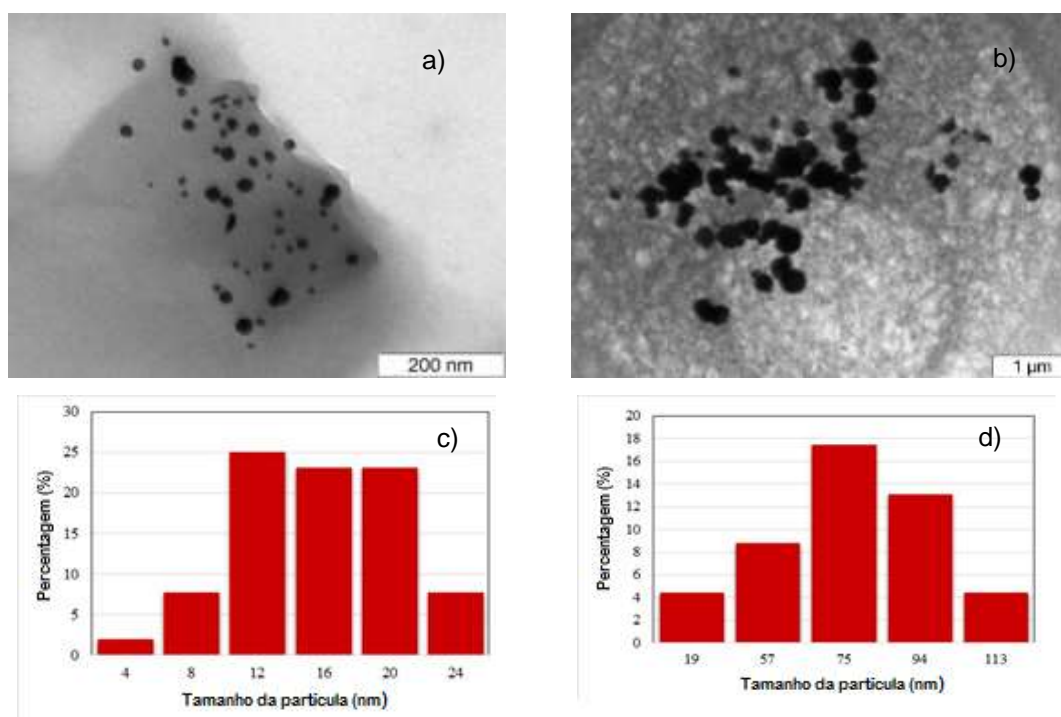


Figura 16 - Imagens de TEM e respetiva distribuição do tamanho das partículas para (a,c) 1% AuNPs/**chá 1** e (b,d) 10% AuNPs/**chá 1**.

As AuNPs obtidas utilizando o **chá 1** são esféricas com diâmetros que variam entre 4-24 nm para as produzidas com solução de chá 1% (1% AuNPs/**chá 1**) ou 19-113 nm para as produzidas com solução de chá a 10% (10% AuNPs/**chá 1**). Para o **chá 2** verifica-se que algumas 1% AuNPs são triangulares, apresentando diâmetros que variavam entre os 17-50 nm, não se verificando o mesmo para a forma das 10% AuNPs que possuem diâmetros que variam entre 258-700 nm, sendo estas últimas bem maiores que as outras nanopartículas sintetizadas, saindo da categoria nanométrica, pelo que não foram efetuados mais estudos com esta solução (10% AuNPs/**chá 2**).

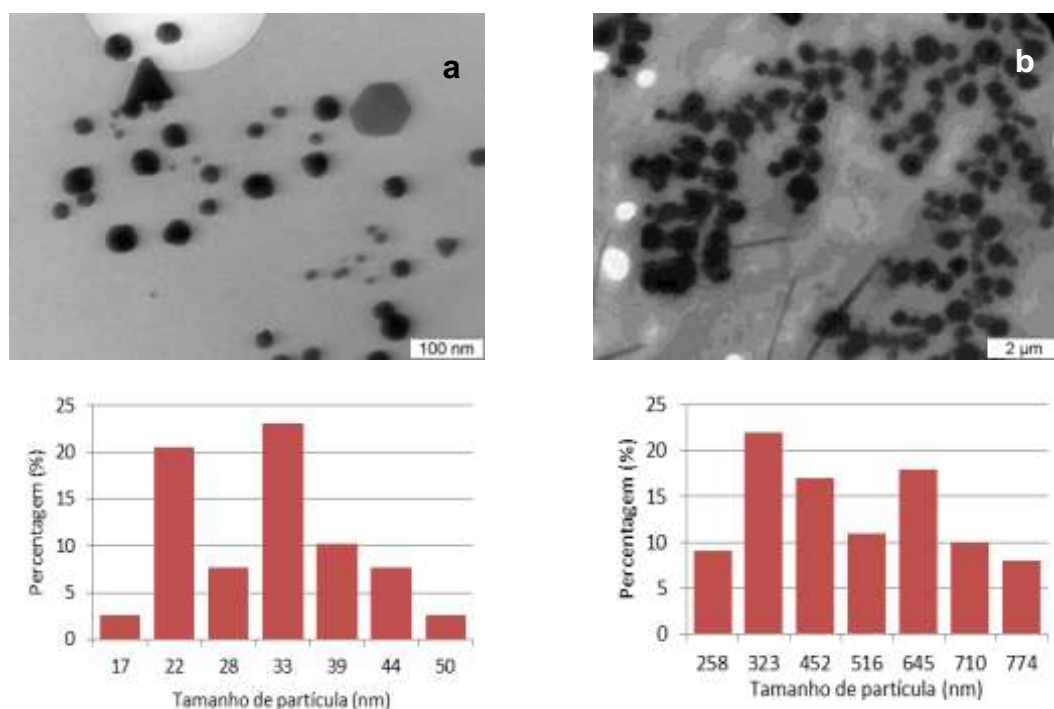


Figura 17 - Imagens de TEM e distribuição do tamanho das partículas para o extrato de **chá 2** com 1% AuNPs (a, c) e 10% AgNPs (b, d).

Microscopia Electrónica de Varrimento e Transmissão e Raio-X de Energia Dispersiva

A técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) permite obter informação sobre a morfologia externa das soluções, composição química e orientação dos materiais da amostra, entre outros. Esta técnica foi utilizada para estudar as AuNPs produzidas através dos **chás 1 e 2**, utilizando extratos de chá de 1% (1% AuNPs) e 10% (10% AuNPs). Ao ampliar as imagens das soluções, é possível observar o que se admite serem as nanopartículas localizadas dentro de estruturas de chá (Figura 21). Para confirmar, foram utilizados dois métodos distintos. Assim sendo, foi possível utilizar um detetor diferente, disponível no equipamento, que utiliza elétrões retrodifundidos, onde os materiais com maior densidade eletrónica, neste caso o metal (ouro), fazem maior contraste, tomando uma aparência mais brilhante (Figura 22). Este método é apenas indicativo da presença de metais, e não do tipo de metais em questão, pelo que a forma mais correta de avaliar o conteúdo da amostra é através da técnica de espectroscopia de raio-X de energia dispersiva (EDS). Como referido anteriormente a técnica SEM pode ser complementada por EDS, através de qual é possível, para um determinada localização na imagem, obter um espectro com informação sobre a sua composição, confirmando todos os elementos presentes nessa superfície (Figura 23).

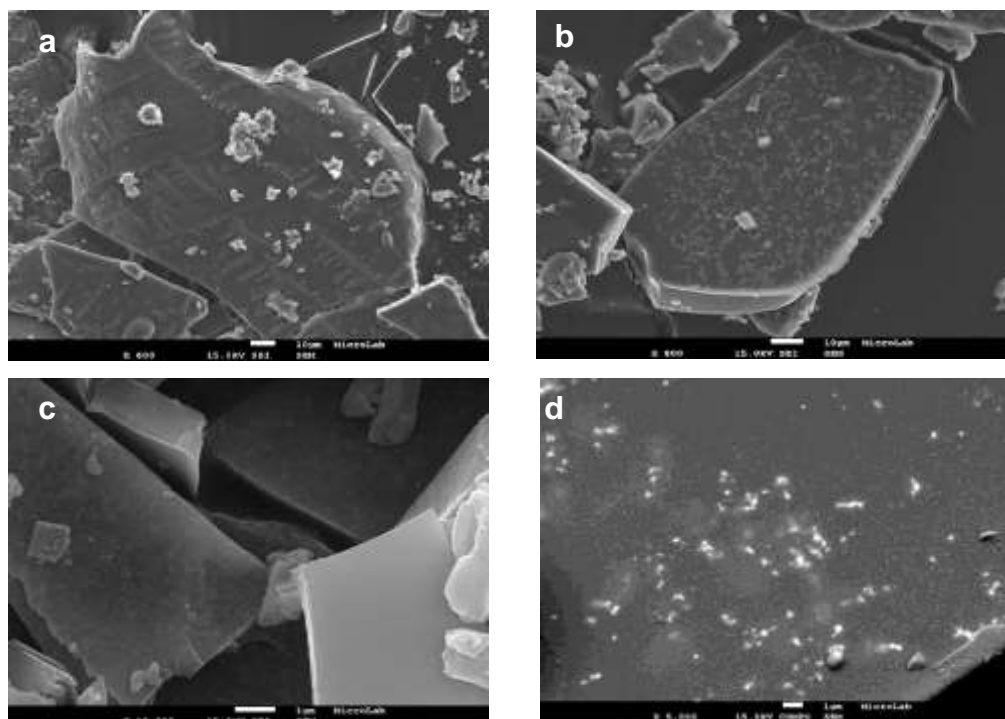


Figura 18 – Imagens de SEM das AuNPs produzidas a partir dos dois tipos de chá com diferentes concentrações. a) 1% AuNPs/**chá 1**, b) 10% AuNPs/**chá 1**, c) 1% AuNPs/**chá 2**, d) 10% AuNPs/**chá 2**.

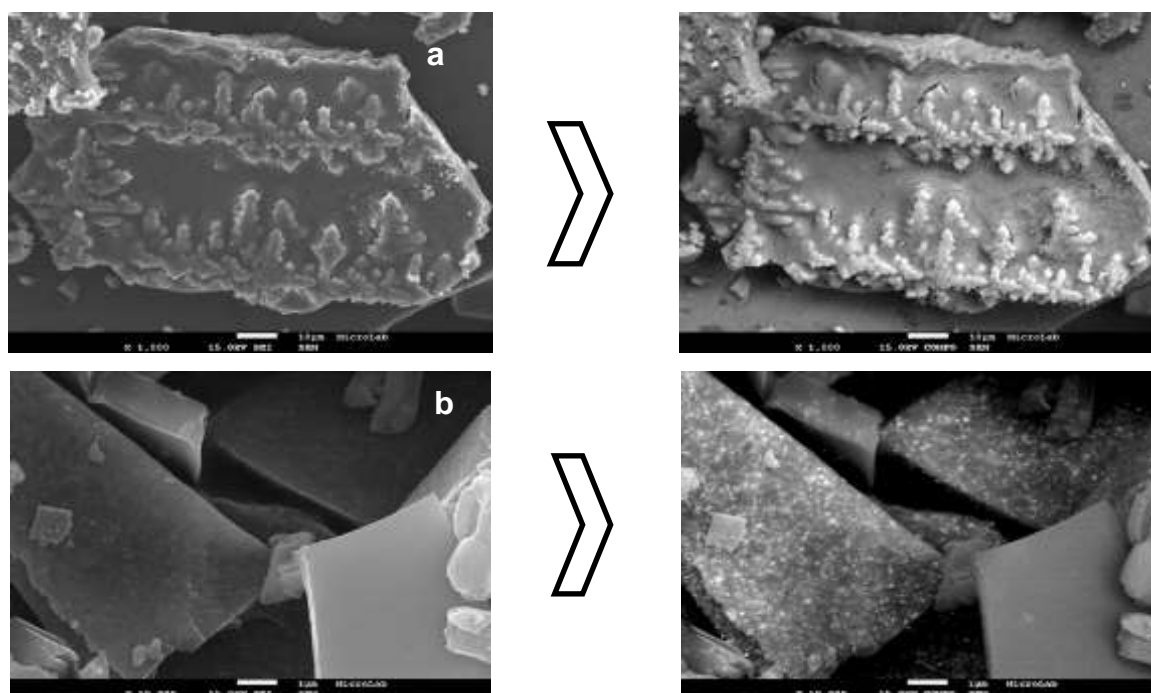


Figura 19 – Imagens de SEM com e sem a utilização do detetor de elétrons retrodifundidos para a identificação de metais na amostra das AuNPs. a) 1% AuNPs/**chá 1** b) 1% AuNPs/**chá 2**.

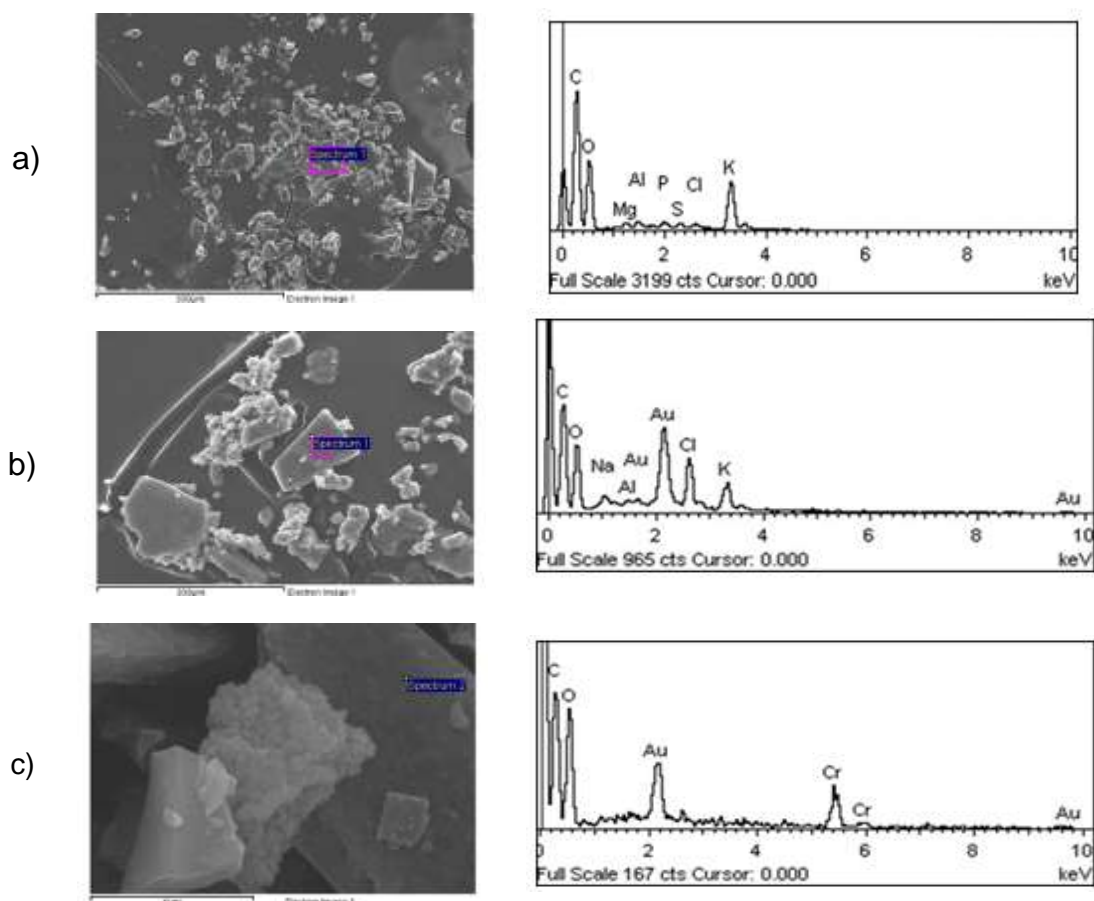


Figura 20 – Imagens de SEM e respectivos resultados da análise EDS a) extrato 1% de **chá 1** (sem NPs); b) 1% AuNPs/**chá 1**; c) 1% AuNPs/**chá 2**.

A análise das AuNPs por EDS confirma a presença dos sinais característicos do ouro. A Figura 23 apresenta as imagens de SEM com a respetiva análise EDS num ponto específico da imagem, para solução de extrato de chá (**1** ou **2**), na presença e na ausência de 1% AuNPs. Nestas análises foram identificados picos de ouro, o que indica a sua presença, como expectável. Os picos correspondentes a C é originário da grelha usada e todos os picos de K, Mg, P e O correspondem à camada que envolve as AuNPs para todas as soluções de chá testados, e confirmado pela amostra do extrato de **chá 1** (Tetley) sem nanopartículas analisada (Figura 23a). Para as 10% AuNPs sintetizadas pelos **chás 1** e **2**, foram obtidos resultados similares aos das soluções de 1% AuNPs (Anexo I).

Com a análise EDS é possível verificar que na zona estudada está presente ouro. No entanto para ter a certeza que o ouro só se encontra localizado nas estruturas muito pequenas semelhantes a dendrites que se visualizam nas imagens, comparou-se a composição de uma zona onde as estruturas são visíveis, e outra onde não e são (Figura 24). Assim, foi confirmado que a presença de ouro se verifica apenas nas zonas onde se observam as estruturas semelhantes a dendrites.

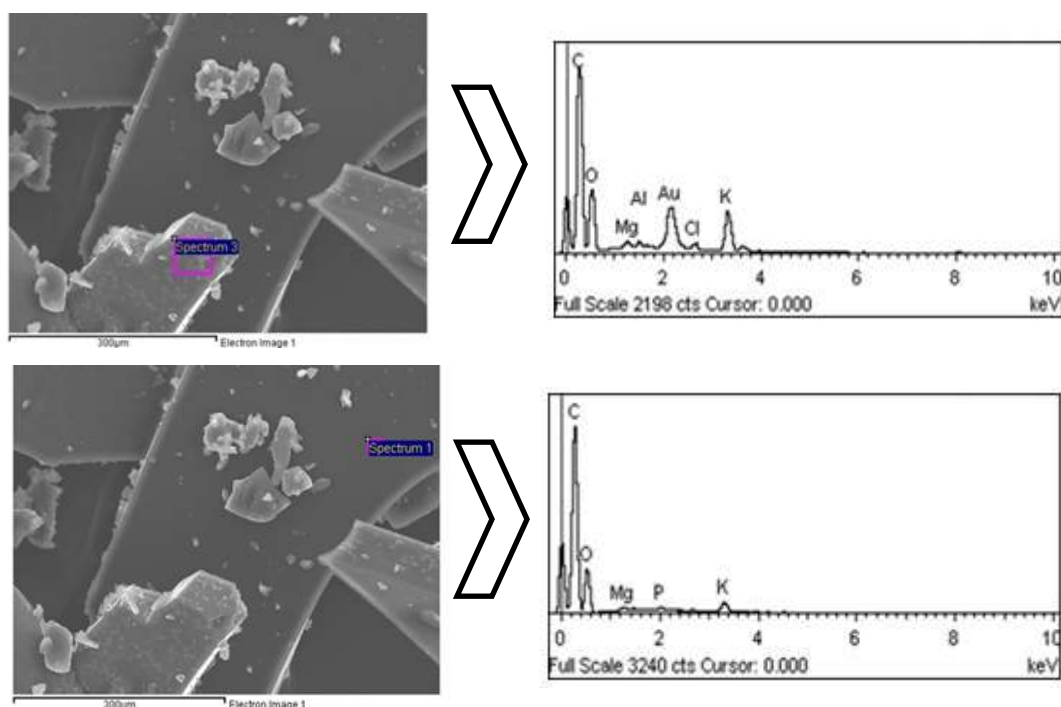


Figura 21 - Análise EDS da amostra de 10% AuNPs/chá 1, em zonas diferentes. a) local onde se observam AuNPs, b) local onde não se observam AuNPs.

As imagens da técnica SEM das AuNPs preparadas por extratos de diferentes chás e com diferentes concentrações são demonstrativas de que com esta abordagem é possível obter uma elevada quantidade de AuNPs e que apresentam uma boa uniformidade. O uso de diferentes concentrações dos extratos de chá faz com que o tamanho das nanopartículas produzidas se altere, mas a sua uniformidade mantém-se (como confirmado por TEM).

II.2.3 – QUANTIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Através das análises efetuadas para caracterizar as nanopartículas produzidas com diferentes extratos e diferentes concentrações, foi possível observar que as nanopartículas sintetizadas apresentavam tamanhos distintos, assim pretende-se quantificar as nanopartículas formadas e a quantidade de átomos que se encontram na sua superfície. A partir dos resultados obtido pela técnica TEM, efetuada e apresentada anteriormente, onde se visualizou partículas de AuNPs esféricas, foi possível retirar o valor do raio médio das nanopartículas sintetizadas. Este cálculos foram efetuados através do método utilizado por Murugadoss⁷⁷.

Pode-se aproximadamente dizer que o volume da nanopartícula (aglomerado) (V_{NP}) é igual ao volume de um átomo (V_{atm}) multiplicado pelo número total de átomos dentro do aglomerado (N), assim, e tendo a informação de que apresentam a forma esférica tem-se:

$$V_{NP} = NV_{atom} \quad (1)$$

$$\frac{4}{3}\pi(r_{NP})^3 = N \frac{4}{3}\pi(r_{atom})^3 \quad (2)$$

Onde o r_{NP} é o raio da nanopartícula e o r_{atom} é o raio atômico.

Rearranjando as equações (1) e (2) e usando o valor de r_{NP} obtido pelas análise TEM para as diferentes nanopartículas formadas e $r_{atom} = 172 \text{ pm}$ (raio atômico do ouro), é possível determinar o número de átomos de ouro por nanopartícula:

$$N = \left(\frac{r_{NP}}{r_{atom}}\right)^3 \quad (3)$$

O número de átomos à superfície, N_s , numa única nanopartícula de ouro, foi estimado utilizando a equação seguinte (equação 4):

$$N_s = 4(N)^{2/3} \quad (4)$$

A quantidade de AuNPs formadas (N_{NP}) depende do número de átomos de ouro, N_{atom} :

$$N_{atom} = \text{numero de moles de ouro} \times N_A \text{ (atoms/mol)} \quad (5)$$

$$N_{NP} = \frac{N_{atom}}{N} \quad (6)$$

Onde N_A é o número de Avogadro.

Assim, o número total de átomos (N_{ts}) de Au na superfície (NPs totais à superfície, que estão disponíveis para a reação catalítica) é dado por:

$$N_{ts} = N_s \cdot N_{NP} = 4 \cdot \frac{N_{atom}}{N^{1/3}} \quad (7)$$

Para o estudo do ouro foi utilizada um valor de concentração de $4,34 \times 10^{-5} \text{ M}$ (concentração de AuNPs mais utilizada nos estudos catalíticos). Assim, pelos resultados obtidos verifica-se que utilizando extratos de chá menos concentrados é possível obter um maior número de nanopartículas, tendo-se utilizado para os estudos efetuados, maioritariamente as AuNPs sintetizadas pelo extrato de chá que apresentava maior número de NPs, as 1% AuNPs/ **chá 1**.

Tabela 4 – Cálculo do número de NPs formadas e do número de átomos de Au à superfície de cada NP, para as AuNPs produzidas com extratos dos **chás 1 e 2**.

Chá	Concentração do extrato (%)	r_{NP} (nm)	N	% Au à superfície	N_{atm}	N_{NP}	N_{ts}
1	1	6,0	$4,2 \times 10^4$	11,5	$8,2 \times 10^{17}$	$1,9 \times 10^{13}$	$9,4 \times 10^{16}$
	10	37,5	$1,0 \times 10^7$	1,8	$8,2 \times 10^{17}$	$8,0 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{16}$
2	1	16,5	$8,8 \times 10^5$	4,2	$8,2 \times 10^{17}$	$9,3 \times 10^{11}$	$3,4 \times 10^{16}$
	10	161,5	$8,3 \times 10^8$	0,4	$8,2 \times 10^{17}$	$9,9 \times 10^8$	$3,5 \times 10^{15}$

Pelos resultados obtidos é possível verificar que soluções com AuNPs de menores tamanhos, apresentam maior número de nanopartículas produzidas e também mais átomos de ouro à superfície, sendo que as soluções de 1% dos dois chás estudados são as que apresentam tamanhos de partículas menores. De notar que para o **chá 1**, a percentagem de ouro à superfície é bem maior relativamente aos outros resultados obtidos, nomeadamente quando comparada com a mesma concentração de extrato de **chá 2**, sendo a sua percentagem, para o **chá 1**, mais de o dobro da verificada para o **chá 2**. É conhecida a dependência da velocidade de uma reação, com o tamanho das partículas e pode ser atribuída a uma maior reatividade às partículas mais pequenas, por apresentarem áreas superficiais maiores, e consequentemente um maior superfície disponível para a catálise.

As AuNPs sintetizadas foram estudadas para várias aplicações, nomeadamente aplicações catalíticas. Assim, especialmente devido a estas aplicações é interessante calcular o número de partículas superficiais, em cada nanopartícula, na solução utilizada, para os estudos catalíticos efetuados, uma vez que está diretamente relacionado com a sua performance catalítica e atividade.⁷⁸ Uma vez que o número de nanopartículas à superfície é dependente do raio das partículas e também da concentração de catalisador utilizada na reação, pretendeu-se calcular o número de partículas à superfície e consequentemente, o número de partículas que reagem, para as diferentes concentrações aplicadas nos estudos catalíticos efetuados, nomeadamente onde se utiliza diferentes concentrações de catalisador (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de nanopartículas formadas e o número de átomos de Au à superfície de cada nanopartícula, para soluções com diferentes concentrações de AuNPs produzidas com o **chá 1**.

[1% AuNPs] (M)	r_{aglom} (nm)	N_{atm}	N_{NP}	N_{ts}
$4,3 \times 10^{-5}$	6	$8,2 \times 10^{17}$	$1,9 \times 10^{13}$	$9,4 \times 10^{16}$
$2,8 \times 10^{-5}$	6	$5,3 \times 10^{17}$	$1,2 \times 10^{13}$	$6,0 \times 10^{16}$
$1,1 \times 10^{-5}$	6	$2,1 \times 10^{17}$	$4,9 \times 10^{12}$	$2,4 \times 10^{16}$
$3,9 \times 10^{-6}$	6	$7,4 \times 10^{16}$	$1,8 \times 10^{12}$	$8,5 \times 10^{15}$
$4,3 \times 10^{-6}$	6	$8,2 \times 10^{15}$	$1,9 \times 10^{11}$	$9,4 \times 10^{14}$

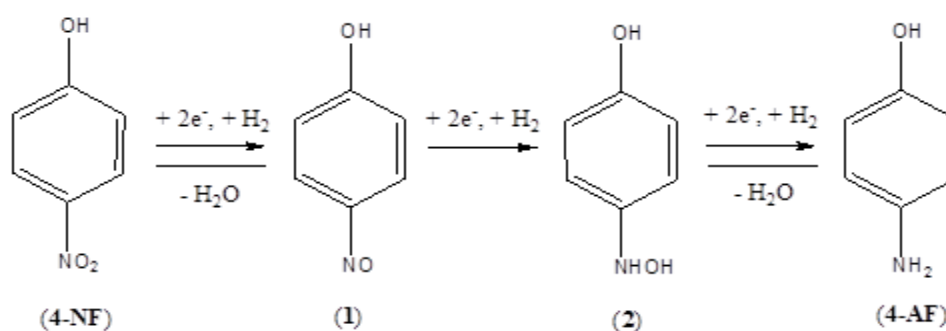
II.2.4– ESTUDOS CATALÍTICOS

A atividade catalítica das AuNPs preparadas foi estudada para a redução de vários compostos nitro aromáticos, nomeadamente 2- e 4-nitrofenol (2- e 4-NF), 2-, 3- e 4-nitroanilina (2-NA, 3-NA e 4-NA) e nitrobenzeno (NB) e ainda na redução do hexacianoferrato(III).

II.2.4.1– Redução do 2- e 4-nitrofenol em meio aquoso

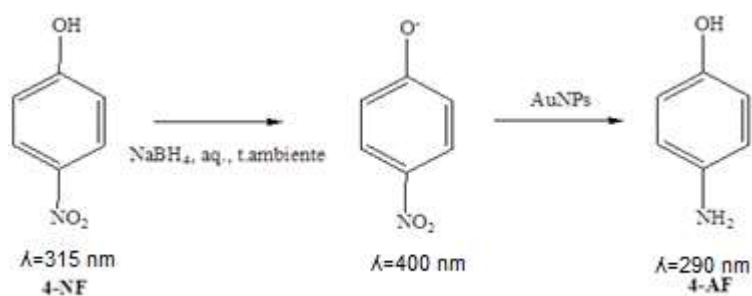
As AuNPs preparadas foram testadas como catalisadores na redução do 2- e 4-nitrofenol (2- e 4-NF), em meio aquoso. A redução catalítica do 4-NF foi originalmente aplicada por Pal *et al.*⁷⁹ e Esumi *et al.*⁸⁰ para testar a atividade catalítica das nanopartículas de Au, Ag, Cu e Pd, livres e imobilizadas. Mais recentemente, este sistema tem sido definido como reação modelo para avaliar a performance catalítica de diferentes NPs mono- e bi-metálicas.^{55,81} O 4-aminofenol (4-AF), produto da reação de redução do 4-NF, é vastamente aplicado na indústria químico e utilizado na produção de analgésicos de venda livre, como o paracetamol.⁵⁴

Foi estudada a redução do 2-NF e 4-NF na presença das AuNPs sintetizadas, usando borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor, em meio aquoso e à temperatura ambiente. O esquema 1 apresenta a redução do grupo nitro, para a reação com o 4-NF, onde este é hidrogenado a 4-nitrosofenol, posteriormente a 4-hidroxiaminofenol e finalmente a 4-aminofenol. Os produtos 2-AF e 4-AF são os únicos produtos de redução, confirmados por espectroscopia de UV-Vis.



Esquema 1 – Redução do 4-nitrofenol (4-NF) a 4-aminofenol (4-AF) via os intermediários *p*-nitrosfenol (1) e *p*-(hidroxiamino)fenol (2).⁸²

Na reação de redução do 2- e do 4-NF, observou-se instantaneamente um desvio no valor dos máximos de absorvância de 340 e 315 nm, correspondentes ao 2- e ao 4-NF, respetivamente, para 410 e 400 nm, após a adição do agente redutor (NaBH_4). Estes novos máximos ($\lambda = 410$ e 400 nm) são atribuídos aos iões 2- e 4-nitrofenolato, formados na presença de NaBH_4 (Esquema 2). Na presença das AuNPs, inicia-se de imediato um decréscimo da intensidade dos picos de absorção correspondentes aos iões 2- ou 4-nitrofenolato, sendo monitorizado por espectroscopia de UV-Vis.



Esquema 2 – Esquema reacional da redução do 4-nitrofenol a 4-aminofenol.

Em condições padrão, a redução do 4-NF ($3,8 \times 10^{-5}$ M) foi realizada na presença das 1% AuNPs ($4,3 \times 10^{-5}$ M) sintetizadas com o **chá 1** e do agente redutor NaBH_4 ($1,6 \times 10^{-3}$ M) à temperatura ambiente e durante 20 minutos. Após a adição do substrato à solução de AuNPs, passou a ser visível a sua banda característica no espectro. No momento em que se adicionou o agente redutor deixou de se observar a banda característica do 4-NF e passou a estar presente a banda característica do íon 4-nitrofenolato, a 400 nm. Os scans seguintes (em intervalos de 2 minutos) evidenciam a diminuição da intensidade da banda do íon 4-nitrofenolato e o aparecimento de uma banda a 235 nm, característica do produto (4-AF). Ao fim de 6 minutos de reação atingiu-se uma conversão superior a 90%. Na Figura 25 também é possível observar, tal como expectável, a banda de absorção típica das AuNPs, não apresentando alterações significativas na posição ou na sua intensidade, ao longo da reação.^{78,83,84}

A redução dos substratos 2- e 4-NF por NaBH_4 , foi monitorizada por espectroscopia de UV-Vis entre 200 e 700 nm, na ausência e na presença de AuNPs, e realizada maioritariamente na presença de 1% AuNPs/**chá 1**. Os picos correspondentes ao 2- ou 4-aminofenol são esperados a ca. 250 ou 290 nm, respetivamente (observado para as soluções puras de 2 e 4-AF). Neste caso, não foi possível observar tal pico, uma vez que se encontra mascarado com o pico de absorção da solução de extrato de chá. Este último é devido à presença de polifenóis e flavonóides confirmando, assim, a forte absorção dos extratos de chá preto na região do ultravioleta.⁸⁵

Após a adição das AuNPs, o doador de eletrões (BH_4^-) e o aceitador de eletrões (íões 2- ou 4-nitrofenolato) são ambos adsorvidos na superfície das nanopartículas e inicia-se imediatamente a redução catalítica através da transferência de eletrões do BH_4^- para os íões nitrofenolato.

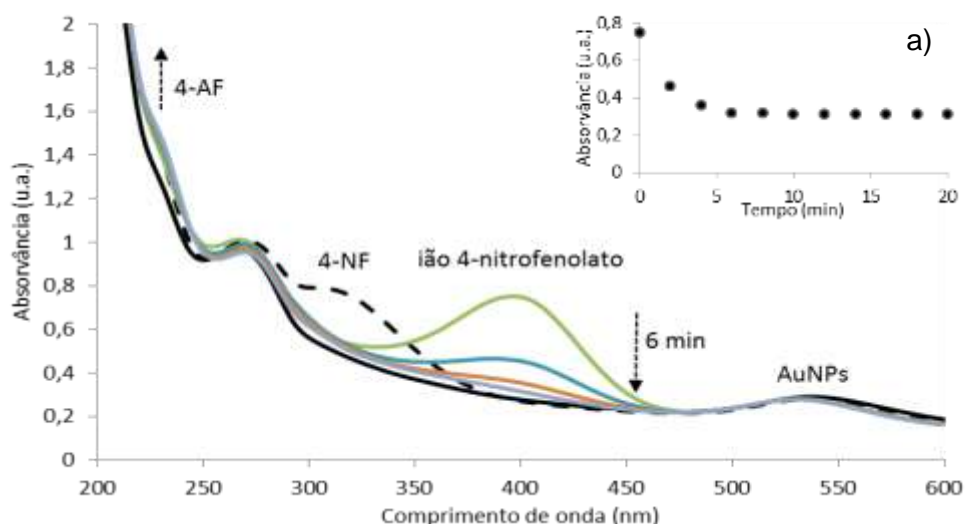


Figura 22 – Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de 1% AuNPs/**chá 1**. Extrato de 1% AuNPs (**chá 1**) (linha preta contínua); adição do 4-NF (linha preta descontinua); formação do ião 4-nitrofenolato (linha verde); progressão da reação monitorizada de 2 em 2 min. Condições reaccionais: [1% AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M; [4-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; $[\text{NaBH}_4]$ = $1,6 \times 10^{-3}$ M. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo de reação.

A redução do 2-NF a 2-AF foi realizada sob as mesmas condições reacionais da reação de redução do 4-NF (Figura 26). A redução deste substrato ocorre gradualmente e a conversão completa a 2-AF é atingida ao fim de 8 minutos.

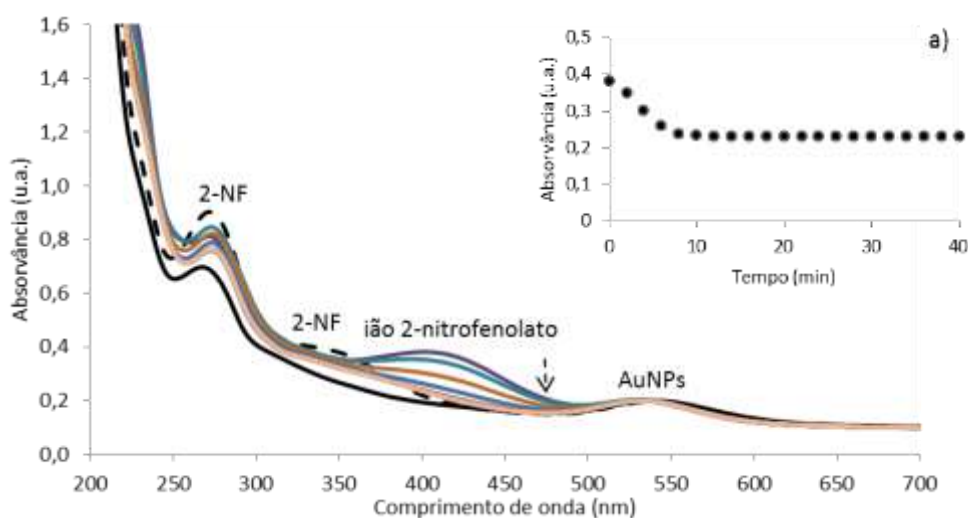


Figura 23 - Espectro UV-Vis da redução do 2-NF na presença de 1% AuNPs (**chá 1**). Condições reaccionais: [1% AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M; [2-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; $[\text{NaBH}_4]$ = $1,6 \times 10^{-3}$ M. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo de reação. Extrato 1% AuNPs (linha preta contínua); adição do 2-NF (linha preta tracejada).

Foi demonstrado que a redução do 2- e 4-NF catalisada por AuNPs segue o modelo estatístico de Langmuir-Hinshelwood,⁸⁶ de acordo com o qual, ambas as moléculas são adsorvidas e a reação biomolecular ocorre à superfície na presença de excesso de agente redutor (NaBH_4).⁸⁴⁻⁸⁸ A velocidade geral da reação é de pseudo-primeira-ordem e dependente da concentração do composto nitro.⁸⁴ As reações de primeira ordem superficiais, dependem fundamentalmente da relação linear entre a energia de adsorção (energia envolvida no transporte de uma molécula de nitrofenol de uma distância infinita e permitir que esta seja adsorvida à superfície da nanopartícula) e aumentam a velocidade da reação.⁸⁹

O papel das estruturas eletrônicas em metais especificamente da camada d (teoria das orbitais moleculares) foi inicialmente modelada por Newns⁹⁰ e posteriormente por Hammer e Nørkov⁹¹ que relaciona a camada d com a energia de ligação (com sinal oposto ao da energia de adsorção, representa a energia requerida para separar a molécula do NF ligada à NP e move-la para uma distância infinita) e tem sido aplicada em várias reações superficiais.

Para a reação do 4-NF na presença das AuNPs foram ainda estudados diferentes parâmetros nomeadamente a utilização de NPs produzidas com diferentes concentrações de **chá 1**, diferentes concentrações de catalisador (AuNPs), diferentes concentrações do agente redutor (NaBH_4) e a utilização de diferentes agentes redutores. Estes estudos foram realizados maioritariamente utilizando como catalisador as NPs formadas com o extrato de **chá 1**.

II.2.4.1.1– Efeito de AuNPs produzidas por diferentes concentrações do extrato de chá

A redução do 4-NF foi estudada na presença de AuNPs formadas a partir de extratos de chá com diferentes concentrações. Nos casos em que foram aplicadas AuNPs obtidas a partir das soluções de chá mais concentradas, 5 ou 10% AuNPs, o 4-NF atinge a conversão final ao fim de 14 minutos (70 ou 67% de conversão, respetivamente), enquanto na presença de AuNPs preparadas usando uma menor concentração de extrato de chá (1% AuNPs), 94% do 4-NF é convertido em 6 minutos (60% nos primeiros 2 minutos). Assim, é possível concluir que as 1% AuNPs são mais eficientes, uma vez que permitem obter uma maior conversão, num menor período de tempo.

As AuNPs obtidas a partir de extratos mais concentrados apresentavam bandas muito fortes, provocando uma distorção no espectro, chegando a impedir a visualização de bandas importantes para o estudo da reação, o que constitui uma grande desvantagem para estudos por espectroscopia de UV-Vis adicionais.

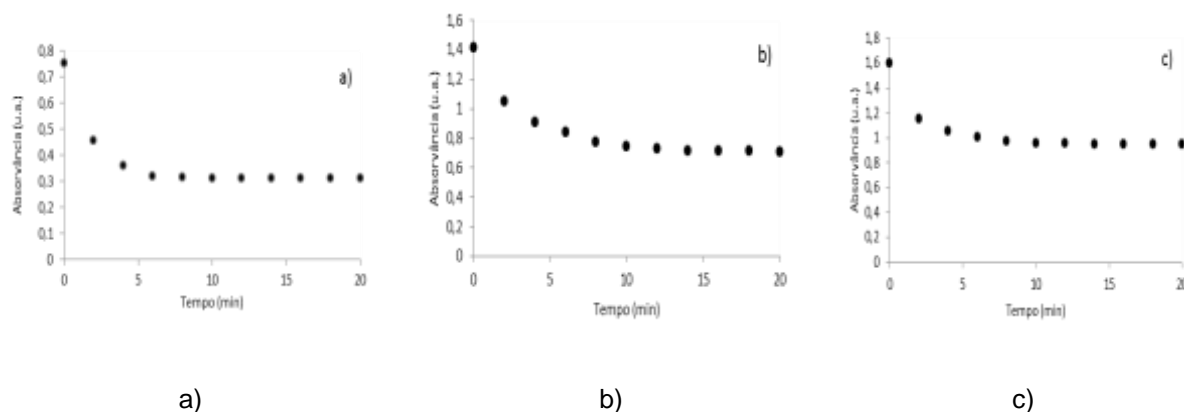


Figura 24 - Gráficos da absorvância a 400 nm vs. tempo de reação na redução do 4-NF, catalisada por a) 1 % AuNPs/**chá 1**, b) 5 % AuNPs/**chá 1**, c) 10 % AuNPs/**chá 1**.

Sabe-se que o tamanho da nanopartícula de metal tem um papel muito importante nos sistemas catalíticos.⁹² Por esta razão, a aplicação de diferentes tamanhos de AuNPs produz resultados distintos.^{89,93,94} Porém, por vezes existe um tamanho de partícula ótimo para um determinado sistema catalítico.^{95,96}

O número de coordenação das AuNPs influencia a facilidade com que o substrato (4-NF) e o agente redutor (BH_4^-) são adsorvidos à superfície das NPs. Assim, NPs de maior dimensão, e portanto com uma maior esfera de coordenação, irão dificultar a aproximação e adsorção dos reagentes, diminuindo a sua performance catalítica. Este efeito é verificado no presente estudo, uma vez que para soluções mais concentradas, *i.e.*, 5 e 10% AuNPs, a conversão do 4-NF está concluída ao fim de 14 minutos e é conseguida uma conversão menor comparativamente com o ensaio em que são utilizadas 1% AuNPs ($4 \text{ nm} \leq 1\% \text{ AuNPs} \leq 24 \text{ nm}$ e $19 \text{ nm} \leq 10\% \text{ AuNPs} \leq 113 \text{ nm}$).

II.2.4.1.2– Efeito da concentração de catalisador

A influência da concentração das AuNPs na redução do 4-NF foi estudada e encontra-se representado na Figura 28. A extensão da conversão é estimada pela diminuição da banda característica do ião 4-nitrofenolato, a 400 nm.

Para concentrações muito baixas de AuNPs ($4,3 \times 10^{-7} \text{ M}$) não se observa conversão do 4-NF a 4-AF. De notar que na ausência de catalisador, a formação do ião 4-nitrofenolato foi observada, mas sem ocorrer conversão a 4-AF e o pico a *ca.* 400 nm, manteve-se inalterado por um longo período de tempo. A alteração da concentração do catalisador de $3,9 \times 10^{-6} \text{ M}$ para $4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ resultou num aumento de conversão. Por exemplo, para uma concentração de $1,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ observou-se uma conversão quase completa após 20 minutos de reação. Para concentrações mais elevadas de $2,8 \times 10^{-5}$ e $4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$, a conversão do 4-NF a 4-AF finaliza-se após 14 minutos ou 6 minutos, respetivamente. Assim é possível concluir que a concentração de $4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ de AuNPs é a mais indicada para o presente sistema catalítico.

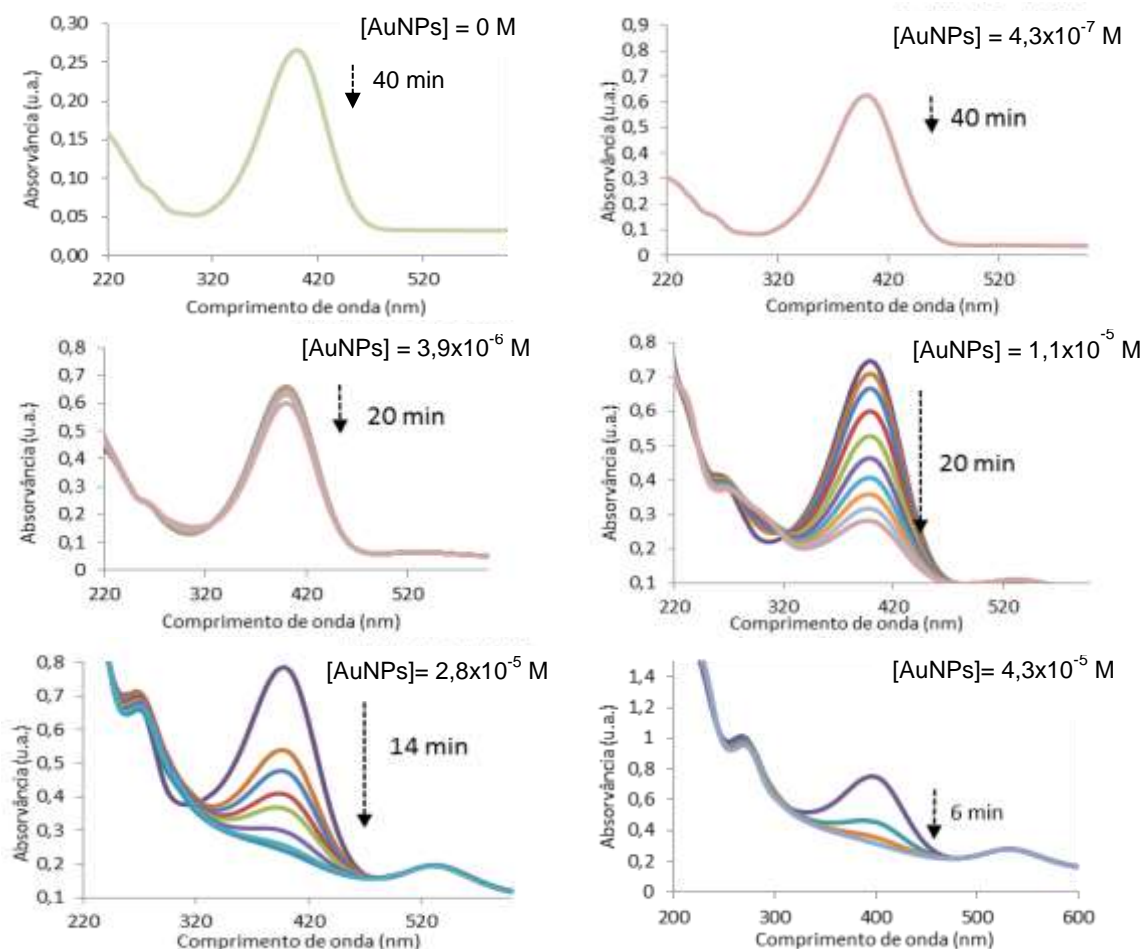


Figura 25 - Espectros de UV-Vis da redução do 4-NF a 4-NA com diferentes concentrações de 1% AuNPs/chá 1. Condições da reação: $[4\text{-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

II.2.4.1.3– Efeito da concentração do agente redutor

A influência da concentração do agente redutor NaBH_4 também foi estudada para a redução do 4-NF (mantendo-se constante a concentração de AuNPs e do 4-NF) (Figura 29). Uma vez que as AuNPs já se encontram formadas, *i.e.*, não sendo necessária a redução do Au, a única função do agente redutor é a redução dos compostos nitro aos respectivos compostos amino.

Na ausência de agente redutor não foi visível sequer a banda do íon nitrofenolato. Para uma concentração de NaBH_4 muito baixa ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$), praticamente não é observada qualquer conversão do 4-NF, mesmo após 40 minutos de reação. O aumento da concentração de NaBH_4 para $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ou $8 \times 10^{-4} \text{ M}$, permite obter conversões de 22 ou 29%, respetivamente, após 20 minutos de reação. Um aumento da quantidade de agente redutor para $1,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ leva a uma conversão gradual dos íões 4-nitrofenolato em 4-aminofenol, ao longo do tempo. É obtida uma conversão de 13% após 2 minutos de reação, de 88% após 14 minutos. Não foi verificada contaminação do catalisador por aminas, durante o período reacional, uma vez que a banda de adsorção de UV-Vis característica das AuNPs continua a ser observada a ca. 538 nm e sem alterações na sua intensidade.

Assim, para concentrações não muito baixas, quando o NaBH_4 é adicionado, o íão 4-nitrofenolato é formado e a reação de redução começa instantaneamente. Acredita-se que as AuNPs iniciam a catálise transferindo carga negativa para o substrato após ambos serem absorvidos na superfície das NPs. A maior concentração de NaBH_4 usada na redução catalítica do 4-NF induz uma cinética mais rápida, que se altera de zero para primeira ordem (Figuras 29 e 30). De facto, a adição de NaBH_4 , com a concentração de $1,6 \times 10^{-3}$ M na mistura reaccional, contendo o extrato de chá com AuNPs e 4-NF, permite a formação instantânea do íão 4-nitrofenolato e transformação completa ao produto 4-aminofenol. A adição de uma maior quantidade de NaBH_4 altera a curva do logaritmo da absorvância vs. tempo (Figura 30), de uma condição de decaimento linear para exponencial.

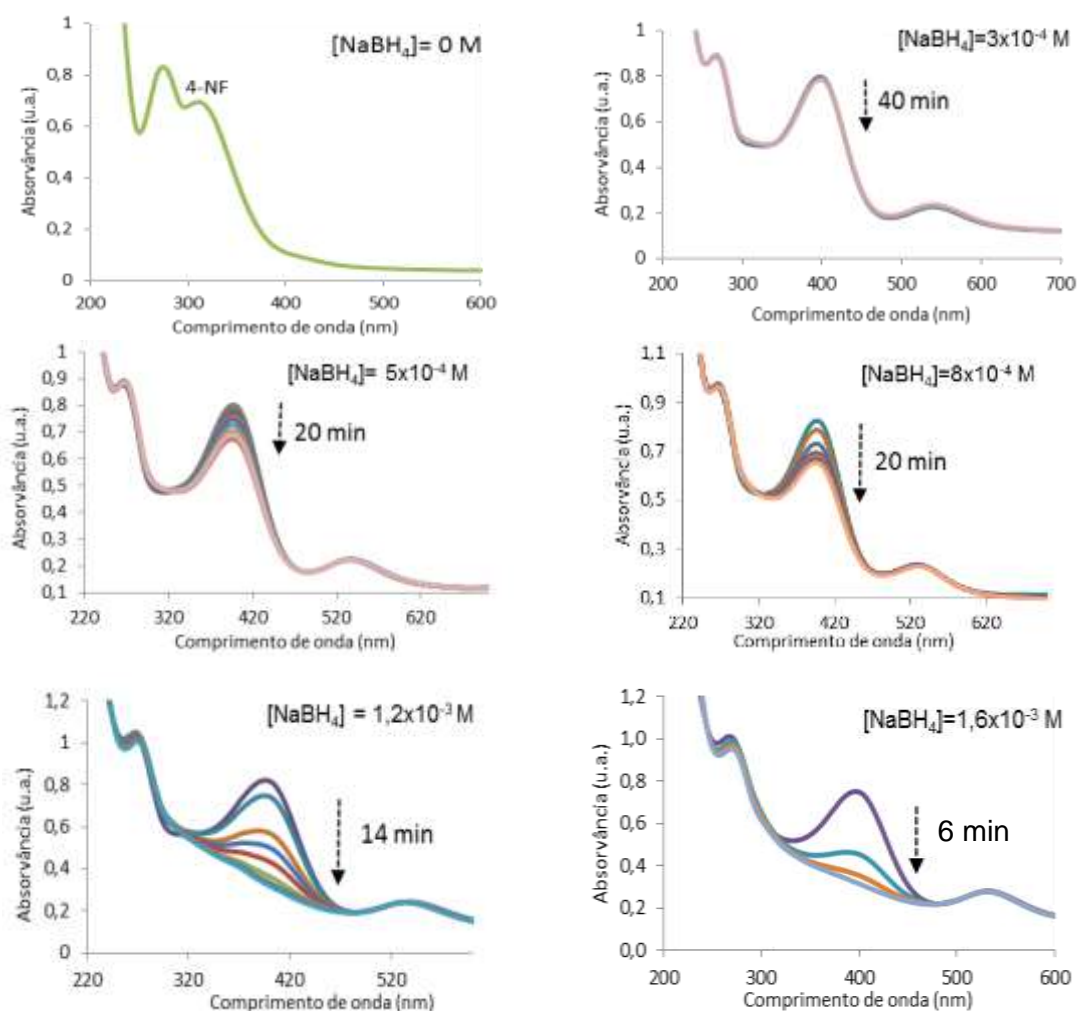


Figura 26 - Espectros UV-Vis da redução do 4-NF catalisada por 1% AuNPs/chá 1, com diferentes concentrações de agente redutor $[\text{NaBH}_4]$. Condições da reação: $[\text{AuNPs}] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $[\text{4-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Foram efetuados estudos, em que se testou a reação na ausência de catalisador e posteriormente na ausência de agente redutor, onde não se verificou conversão do substrato, no produto. Assim, e com os resultados obtidos para os estudos de diferentes concentrações de agente redutor e catalisador é possível verificar que as nanopartículas de ouro também promovem a redução do 4-nitrofenol, nomeadamente promovem a transferência de elétrons do borohidreto para o ião 4-nitrofenolato, baixando a energia de ativação da reação.⁸⁸

Em todos os casos a banda correspondente às nanopartículas de ouro manteve-se muito forte e visível até à conversão completa do substrato.

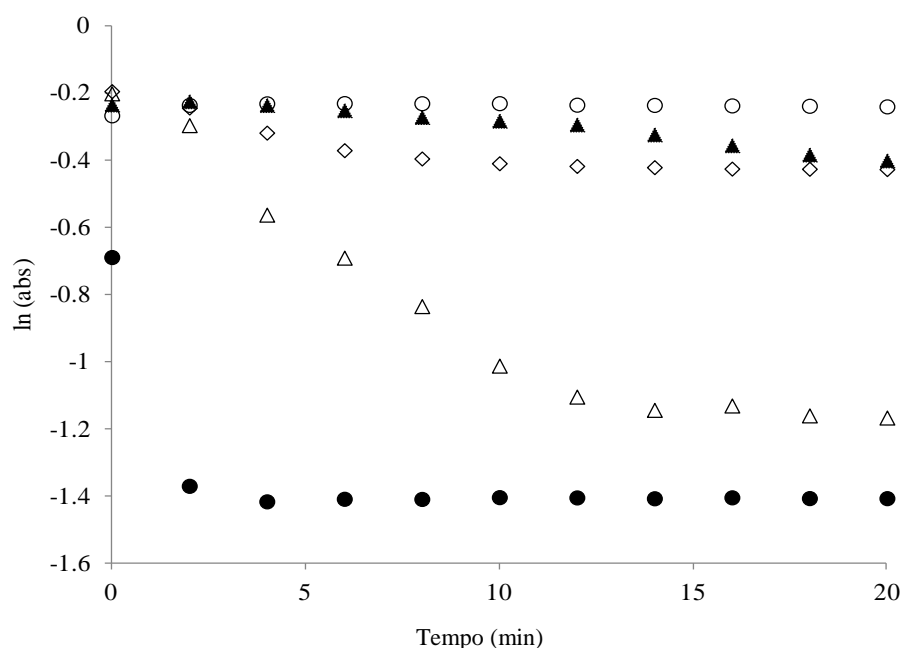


Figura 27 – Efeito na redução do 4-NF a 4-AF com concentrações variáveis de NaBH₄. ○ - [NaBH₄] = 3x10⁻⁴ M; ▲ - [NaBH₄] = 5x10⁻⁴ M; ◇ - [NaBH₄] = 8x10⁻⁴ M; △ - [NaBH₄] = 1,2x10⁻³ M; ● - [NaBH₄] = 1,6x10⁻³ M; absorvâncias medidas ao comprimento de onda de 400 nm.

II.2.4.1.4– Efeito de diferentes agentes redutores

Foi estudado o efeito de diferentes agentes redutores, para além do NaBH₄, onde foram utilizados redutores mais fracos, mas mais ecológicos. Assim, foram utilizados a hidrazina, o ácido ascórbico, a d-glucose, o cloreto de amónio e trietilsilano. Estes estudos foram efetuados nas condições padrão (estudo da Figura 31 para a hidrazina e Anexo B para os restantes agentes redutores). Para estes estudos observou-se que na presença de hidrazina é observada a formação do ião 4-nitrofenolato, no entanto, a conversão a 4-aminofenol é muito pequena. Usando os outros agentes não se observa sequer a formação do ião intermediário. Deste modo, é possível concluir que o NaBH₄ é o melhor agente redutor entre os estudados e o único que consegue favorecer esta redução, nas condições catalíticas escolhidas.

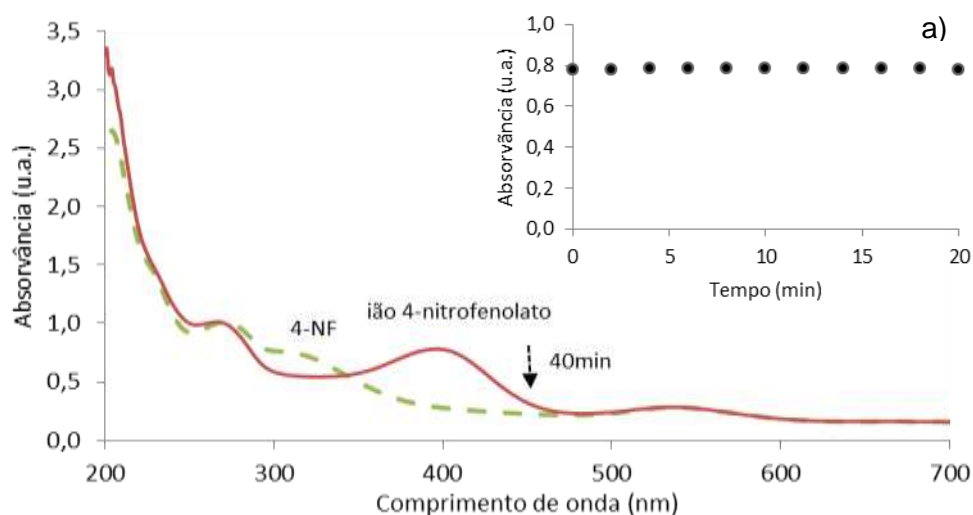


Figura 28 - Espectro UV-Vis da redução do 4-NF catalisada por 1% AuNPs/**chá 1** e utilizando hidrazina como agente redutor. Espectro do extrato de chá com AuNPs e 4-NF (linha verde descontinua); formação do íon 4-nitrofenolato (linha vermelha). a) gráfico da absorvância a 400 nm vs. tempo de reação.

II.2.4.1.5– Efeito de AuNPs obtidas com diferentes extratos de chá

Foi avaliada a atividade de NPs obtidas a partir de extratos do **chá 2** na redução do 4-NF, nas mesmas condições reacionais (Figura 32), verificando-se que a reação é mais lenta comparativamente à reação realizada na presença de AuNPs obtidas com o **chá 1** (94% em 6 min).

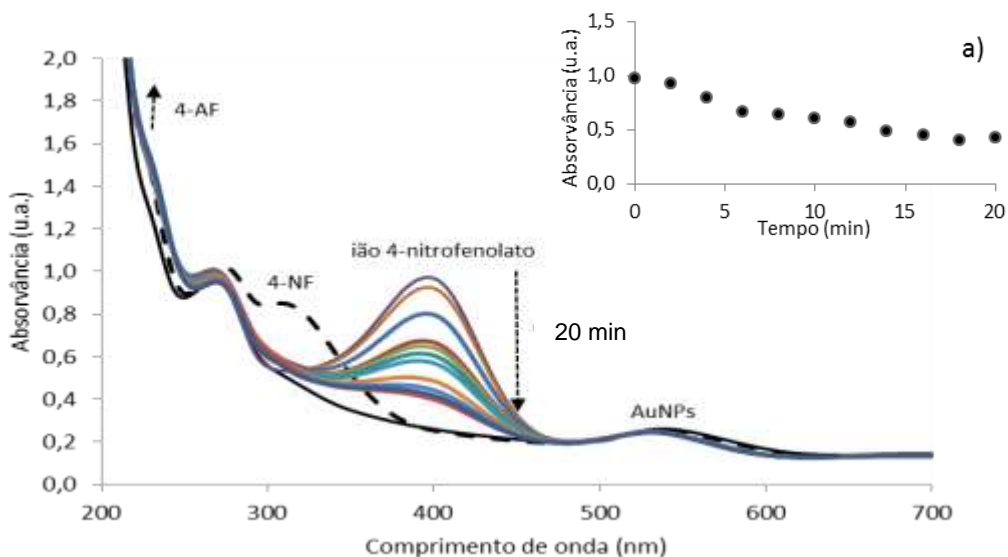


Figura 29 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de 1% AuNPs/**chá 2**. AuNPs (linha preta contínua); adição do 4-NF (linha preta descontinua); formação do íon 4-nitrofenolato (linha roxa), progressão da reação monitorizada de 2 em 2 min. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo.

Pelos estudos efectuados é possível concluir que as 1% AuNPs/**chá 1** são as mais eficientes na redução do 4-NF a 4-AF, com NaBH_4 , que as equivalentes obtidas com o extrato de **chá 2**. As condições reaccionais foram optimizadas, pelo que foi possível concluir que a melhor concentração de AuNPs é de $4,3 \times 10^{-5}$ M, a de 4-NF é $3,8 \times 10^{-5}$ M e a do agente redutor, NaBH_4 é $1,6 \times 10^{-3}$ M.

II.2.4.1.1– Estudos cinéticos

Realizaram-se os estudos da cinética da reacção de redução do 4-NF, com base na diminuição da banda de absorção do ião 4-nitrofenolato (a 400 nm). Uma vez que a absorvância da banda característica para o ião 4-nitrofenolato é proporcional à sua concentração no meio e consequentemente à concentração de 4-NF, a razão entre a absorvância no tempo t (A) e a absorvância inicial em $t = 0$ (A_0), isto é, $\frac{A}{A_0}$, poderia ser utilizada como a razão das concentrações de 4-NF no instante t em relação a t_0 , isto é, $\frac{A}{A_0} = \frac{C}{C_0}$. O agente redutor NaBH_4 foi maioritariamente utilizado em excesso relativamente ao 4-NF. A reacção pode ser considerada como uma reacção de pseudo-primeira ordem.

$$-\frac{dc}{dt} = k_{\text{app}} \cdot c \quad (8)$$

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k_{\text{app}} \cdot t \quad (9)$$

Assim, a constante de velocidade aparente, k_{app} , pode ser determinada directamente a partir do declive da correlação linear de $\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ vs. t , como apresentado na Figura 33 para a reacção do 4-NF nas condições padrão. Verifica-se que a reacção cessa após os 6 minutos, não havendo alteração no valor da absorvância a partir desse instante, (Figura 33a) pelo que para a determinação da constante de velocidade aparente, se utilizam os valores registados durante esse período de reacção (6 minutos).

Os valores da constante k_{app} também foram determinados para os estudos onde se variou a concentração de catalisador e do agente redutor. Estes resultados encontram-se apresentados na Tabela 3 e representados na Figura 34. De acordo com a Figura 34, a constante de velocidade aparente (k_{app}) da reacção é linearmente proporcional à quantidade de catalisador. Pela representação gráfica obtida é possível concluir que se trata de uma reacção de pseudo-primeira ordem, com um bom ajuste à linearidade ($R^2 = 0,9946$).

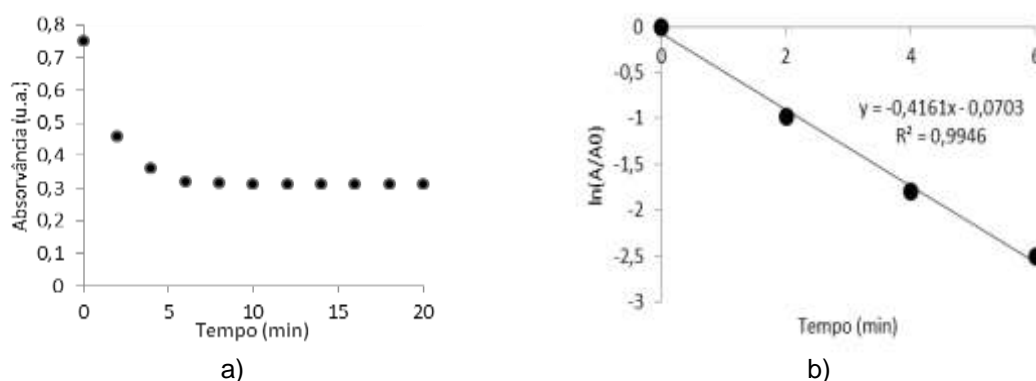


Figura 30 – Determinação do valor de k_{app} , para a reação do 4-NF nas condições padrão ($[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5}$ M; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5}$ M; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3}$ M), a partir dos valores de absorvância ao longo do tempo (Tabela 6, entrada 1). a) Absorvância a 400 nm vs. Tempo de reação; b) linearização de A/A_0 vs. tempo.

Também foi possível calcular o valor da frequência de turnover (*turnover frequency*, TOF), que é uma medida da velocidade de reação específica baseada na frequência com que as moléculas reagem num centro ativo. O TOF muitas vezes é calculado a partir do valor do número de *turnover* (*turnover number*, TON), sendo este o valor de TON, em função do tempo. Para o cálculo do TOF a velocidade da reação é normalizada para o número de átomos metálicos presentes na superfície do catalisador, podendo ser determinado pelo número de moléculas que reagem na presença de catalisador no tempo t para produzir o produto (M) e o número de átomos à superfície do catalisador que estão envolvidos na reação (equação 10).⁹⁷

$$TOF = \frac{M}{N_{ts} \cdot t} \quad (10)$$

onde N_{ts} é o número de átomos à superfície do catalisador que estão envolvidos na reação. As AuNPs utilizadas no estudo de diferentes concentrações de catalisador foram sintetizadas a partir do extrato 1% do **chá 1**, pelo que o valor maioritário do raio das AuNPs é de 6 nm, determinado pela análise TEM.

Tabela 6 – Valores de k_{app} das reações estudadas com diferentes concentrações de catalisador e respetivo TOF da reação.^a

Entrada	[1% AuNPs] (M)	$k_{app} \times 10^3$ (min ⁻¹)	Tempo (min)	Conversão (%)	N_{ts}	TOF ^b (h ⁻¹)
1	$4,3 \times 10^{-5}$	416	6	94,0	$2,3 \times 10^{11}$	71,8
2	$2,8 \times 10^{-5}$	278	14	93,1	$1,5 \times 10^{11}$	47,6
3	$1,1 \times 10^{-5}$	109	18	72,1	$5,9 \times 10^{10}$	73,1
4	$3,9 \times 10^{-6}$	39	20	9,3	$2,1 \times 10^{10}$	23,6
5	$4,3 \times 10^{-7}$	4	40	0,4	$2,3 \times 10^9$	4,6

^aCondições reaccionais: $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5}$ M; $[1\% AuNPs] = 4,34 \times 10^{-5}$ M. ^bTOF = TON por hora.

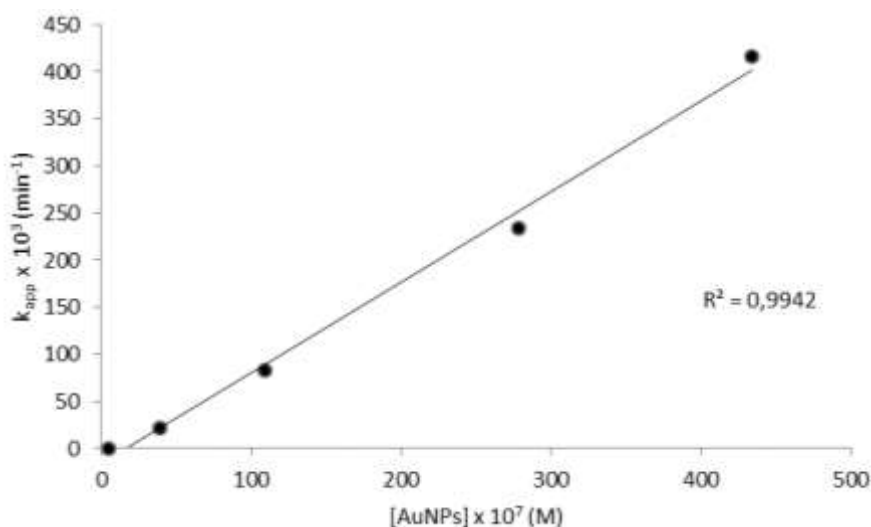


Figura 31 - Valores k_{app} para as reações estudadas vs. a concentração de 1% AuNPs/chá 1.

Como esperado, a taxa de redução do 4-NF aumenta linearmente com a concentração de catalisador,⁹⁸ tal como mostrado na Figura 34. Uma tendência similar foi observada por Panigrahi *et al.*⁷⁸ para a mesma reação em catálise homogênea utilizando AuNPs com 20 nm.

Verificou-se que, aumentando a quantidade de catalisador, a velocidade da reação aumenta linearmente para um tamanho de partículas específico, mantendo os outros parâmetros inalterados, como reportado em outros trabalhos^{31,44}. Um comportamento semelhante foi observado por Gangula *et al.*⁸⁹ com AuNPs produzidas naturalmente (a partir do extrato da haste de *Breynia Rhamnoides*), embora de maior dimensão (30 nm), e, portanto, menos ativas que as AuNPs preparadas neste trabalho.

A influência da concentração de NaBH_4 foi também estudada para a redução do 4-NF, na presença de 1% AuNPs/chá 1. O cálculo da constante de velocidade aparente (k'_{app}) é realizada partindo do princípio de que a reação segue uma lei de pseudo-primeira ordem (Equações 11 e 12), tal como efetuado para os estudos de diferentes concentrações de catalisador.

$$-\frac{dc}{dt} = k'_{app} \cdot c \quad (11)$$

$$\ln(c/c_0) = -k'_{app} \cdot t \quad (12)$$

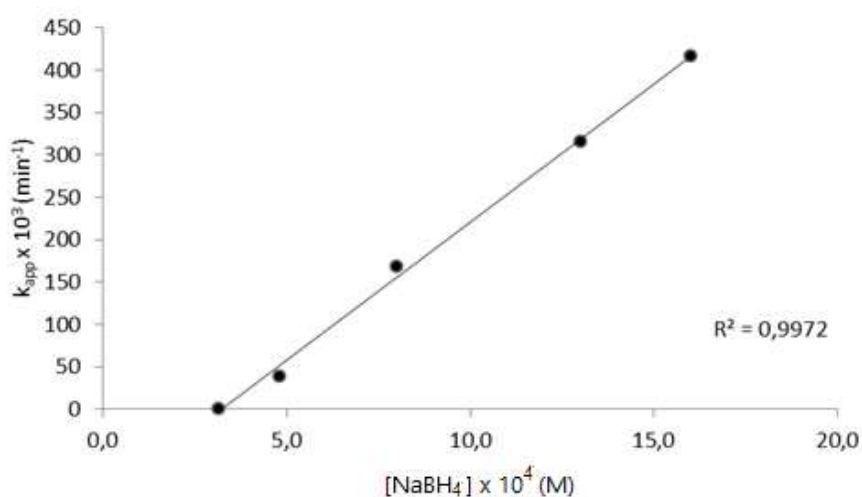
onde c e c_0 são as concentrações do íon 4-nitrofenolato ao tempo t e a $t = 0$, respetivamente, e sendo $\ln(c/c_0) = \ln(A/A_0)$, onde A e A_0 são as absorvâncias a 400 nm para os referidos tempos.

Os valores de k'_{app} calculados, para as reações realizadas, utilizando diferentes concentrações de agente redutor (NaBH_4), com diferentes valores de concentração do agente redutor estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Valores da constante aparente e do TOF das reações estudadas com diferentes concentrações de agente redutor.^a

[NaBH ₄] (M)	$k'_{app} \times 10^3$ (min ⁻¹)	Tempo (min)	Conversão %	TOF ^b (h ⁻¹)
$3,0 \times 10^{-4}$	1	40	2,4	0,3
$5,0 \times 10^{-4}$	38	20	22,1	5,1
$8,0 \times 10^{-4}$	168	20	29,3	6,7
$1,2 \times 10^{-3}$	315	14	88,2	28,9
$1,6 \times 10^{-3}$	416	6	94,0	71,8

^aCondições reacionais: [4-NF] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; [1% AuNPs] = $4,34 \times 10^{-5}$ M. ^bTOF = TON por hora.

Figura 32 - Valores k_{app} para as reações estudadas vs. a concentração de agente redutor.

A redução do 4-NF ocorre mais rapidamente na presença de concentrações mais elevadas de NaBH₄, passando de uma cinética de ordem zero para uma de primeira ordem, como demonstrado anteriormente (Figura 29). A reação pode ser considerada como uma reação de pseudo-primeira ordem, uma vez que o ajuste dos k'_{app} calculados assume uma forma linear, com uma boa aproximação ($R^2 = 0,9972$), semelhantes às descritas para outros sistemas.^{55,78,99}

II.2.4.2– Redução da 2-, 3- e 4-nitroanilina em meio aquoso

A atividade catalítica das AuNPs também foi estudada para a redução da 2-, 3- e 4-NA, usando NaBH_4 como agente redutor. O produto de redução da 4-NA, a 4-fenilenodiamina (4-FD), é um importante composto do grupo aminobenzeno, com aplicações em corantes, borrachas e pode ser usada como precursor para fibras têxteis de aramida e termoplásticos.¹⁰⁰⁻¹⁰² Na indústria, a preparação da 4-FD envolve sempre a hidrogenação catalítica da 4-NA.¹⁰³ Por este motivo, é de grande interesse desenvolver um método simples e económico de preparação do 4-FD. Recentemente, foram reportadas a redução fotocatalítica da 4-NA a 4-FD sobre $\text{SrBi}_2\text{Nb}_2\text{O}_9$ na forma microcristalina¹⁰⁴ ou em suspensões aquosas de TiO_2 , na presença de condições anaeróbicas¹⁰⁵.

A atividade catalítica das 1% AuNPs/**chá 1** na redução da 2, 3 e 4-NA foi estudada nas melhores condições reacionais verificadas para a redução do 4-NF (Figura 36). A redução da 2-NA apresenta um maior tempo de indução (tempo de difusão que o substrato necessita para ser adsorvido sobre a superfície do catalisador, antes da reação poder ser iniciada)⁵⁵, relativamente aos outros substratos estudados (3- e 4- NA), uma vez que ao fim de 4 minutos praticamente não ocorre qualquer redução, para depois sofrer uma redução acentuada dos 4 ao 6 minutos de reação. No entanto, para ambos os substratos 2- e 3-NA, verifica-se que a conversão final é obtida ao fim de 8 minutos de reação, sendo estas de 84 e 50 %, respetivamente, enquanto que para a 4-NA, se obtém uma conversão de 78 %, ao fim de apenas 4 minutos.

Para a reação de redução da 4-NA, a sua banda de absorvância a 380 nm diminui gradualmente de intensidade ao longo da reação, usando NaBH_4 na presença de 1% AuNPs (Figura 36c). A banda característica da 4-fenilenodiamina (4-FD) surge normalmente a 238 nm, mas no presente caso não é visível, devido à sua sobreposição com o pico de absorvância do extrato de chá. Durante o curto espaço de tempo em que a reação foi estudada (20 min) não foram detetados outros produtos. Noutros estudos e após um longo período de reação, foi possível detetar a reoxidação dos grupos amina da 4-FD.¹⁰⁴

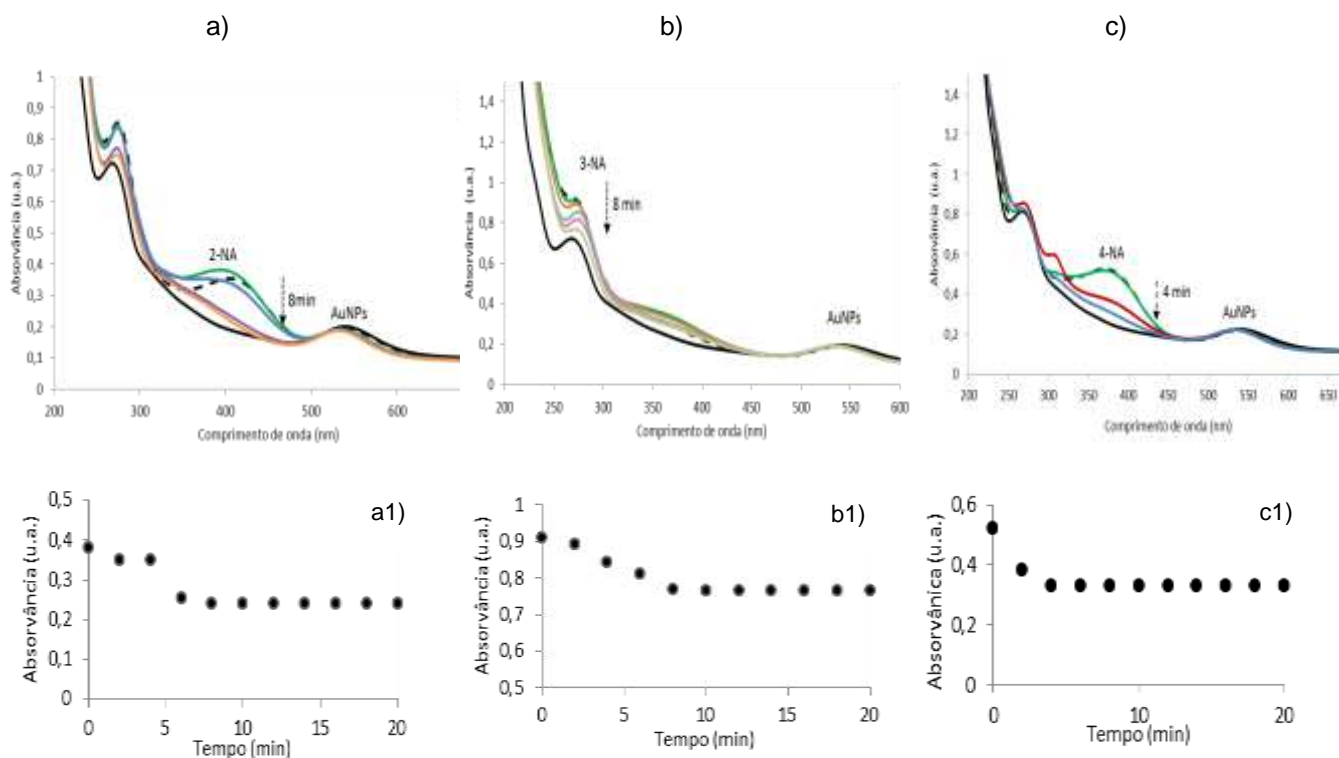


Figura 33 - Espectros de UV-Vis da redução da a) 2-NA; b) 3-NA; c) 4-NA. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[substrato] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. 1% AuNPs/chá 1 (linha preta) ; após a adição do 4-NA (linha preta tracejada); após a adição do agente redutor (linha verde); scans de 2 em 2 min. Representação da absorvância vs o tempo, para o c.d.o. fixo de a1) 394 nm e b1) 270 nm c1) 380 nm.

Para a reação da 4-NA também foram efetuados outros estudos, nomeadamente a utilização de diferentes agentes redutores e a utilização de outro extrato de chá.

II.2.4.2.1– Efeito de diferentes agentes redutores

Neste estudo foram testados outros agentes redutores, tais como a hidrazina, a d-glucose e trietilsilano, à semelhança do estudo efetuado para o substrato 4-NF, por serem redutores mais ecológicos.

Observou-se que ao efetuar a reação na presença de trietilsilano ocorre apenas uma redução muito ligeira durante os 20 minutos de reação (Figura 37). Para os outros agentes redutores testados não se verificou qualquer redução (Anexo C).

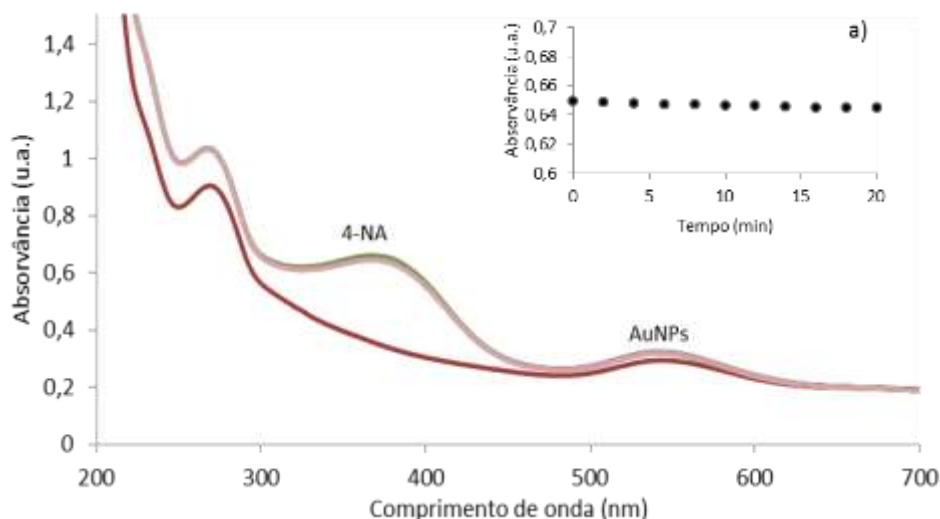


Figura 34 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-NA catalisada por 1% AuNPs/**chá 1** e utilizando trietilsilano como agente redutor. a) gráfico da absorvância a 380 nm vs. tempo de reação.

II.2.4.2.2– Efeito de AuNPs obtidas com diferentes extratos de chá

Verificou-se que as 1% AuNPs/**chá 2** (Figura 38), são menos eficientes que as 1% AuNPs/**chá 1**, uma vez que com as primeiras é possível obter a conversão total ao fim de cerca de 4 minutos, enquanto as segundas demoram cerca de 16 minutos para obter o mesmo resultado.

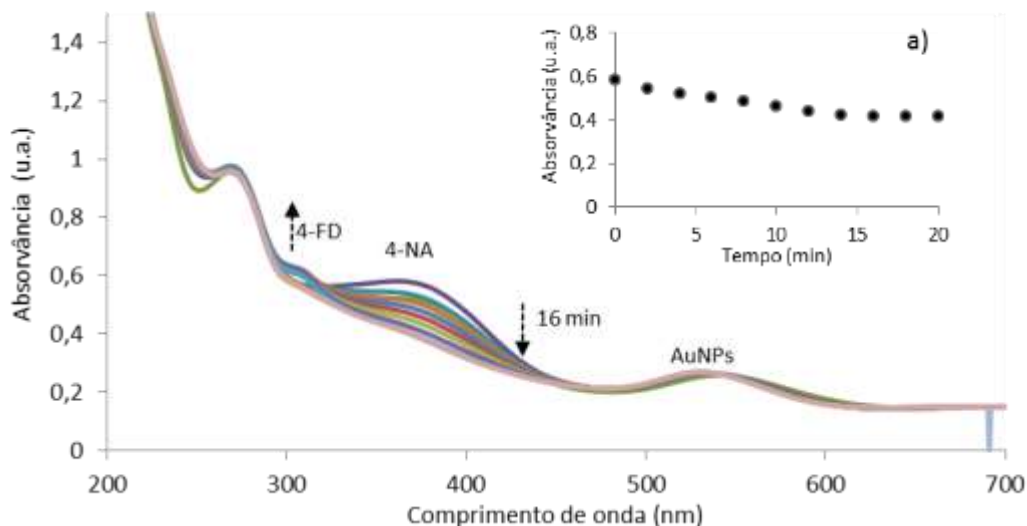


Figura 35 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-NA na presença de 1% AuNPs/**chá 2**. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 380 nm vs. tempo.

Pelos estudos efetuados verificou-se que, tal como para o 4-NF, a redução da 4-NA é favorecida pelas 1% AuNPs/**chá 1** e quando se utiliza $NaBH_4$ como agente redutor (nas condições

padrão), uma vez que é quando se obtém uma maior conversão e num período de tempo bastante curto. Para o substrato 2-NA foi obtida uma conversão maior que para a 4-NA, mas demora o dobro do tempo a obter a sua conversão final. No entanto, verificou-se que mesmo com mais tempo de reação para a 4-NA, a sua conversão não aumenta significativamente.

Pelos estudos efetuados para os substratos 2 e 4-NF, bem como para o 2-, 3- e 4-NA, verificou-se que a conversão é mais eficiente para os compostos com o grupo nitro na posição 4- em comparação com as posições 2- e 3-. À semelhança do 4-NF, a conversão da 4-NA a 4-FD é obtida com bastante rapidez, observando-se a conversão final em poucos minutos (4 min).

II.2.4.3– Redução do nitrobenzeno em meio aquoso

A redução do nitrobenzeno (NB) é uma reação amplamente estudada, nos últimos anos. Desde o trabalho clássico de Haber¹⁰⁶, que os seus intermediários são bem conhecidos.¹⁰⁷ No denominado método direto, o NB é reduzido a nitrosobenzeno e depois a fenilhidroxilamina. No passo final a fenilhidroxilamina é reduzida a anilina (AN). Na via de condensação, os intermediários nitrosobenzeno e a fenilhidroxilamina reagem formando o azoxibenzeno que é de seguida reduzido a anilina. Trabalhos recentes têm revelado que na presença de AuNPs a reação ocorre apenas pela via direta, não sendo encontrado vestígios de azoxibenzeno ou de outros produtos.^{88,103,108,109}

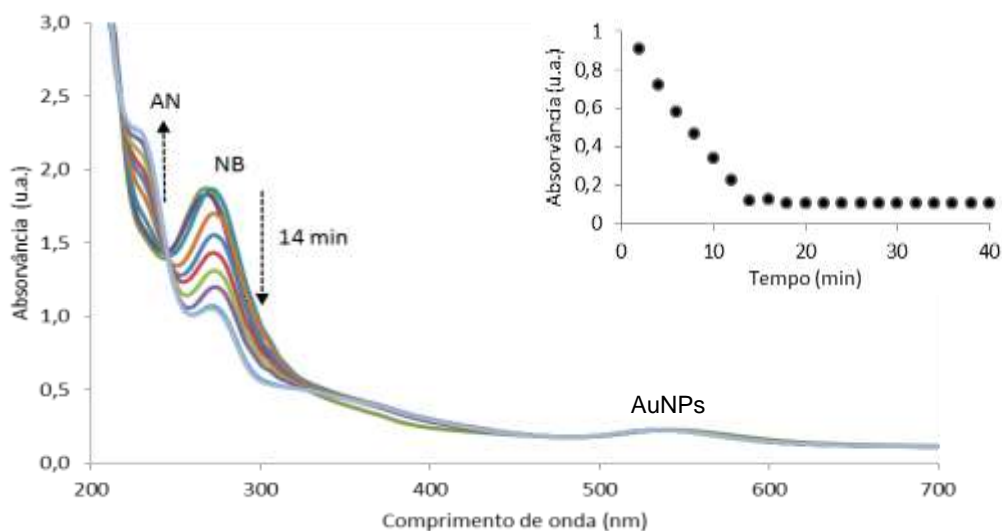


Figura 36 - Espectro de UV-Vis da reação de redução do nitrobenzeno catalisada por AuNPs. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NB] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

As AuNPs são menos reactivas na redução NB que na redução dos restantes compostos estudados, obtendo-se uma conversão de ca. 86%, após 14 minutos (varrimentos de 2 em 2 minutos) de reação (Figura 39). Após 40 minutos de reação, esta ainda não estava concluída. Para esta reação também foram testados outros agentes redutores como a hidrazina e trietilsilano e a utilização de AuNPs/chá 1.

II.2.4.3.1– Efeito de diferentes agentes redutores

Para este estudo foram utilizados como agentes redutores a hidrazina e o trietilsilano, à semelhança dos estudos efetuados para alguns substratos apresentados anteriormente. Para estes estudos observou-se que na presença destes dois redutores, a reação não decorre, não exibindo qualquer redução ao longo dos 20 minutos em que foi testada.

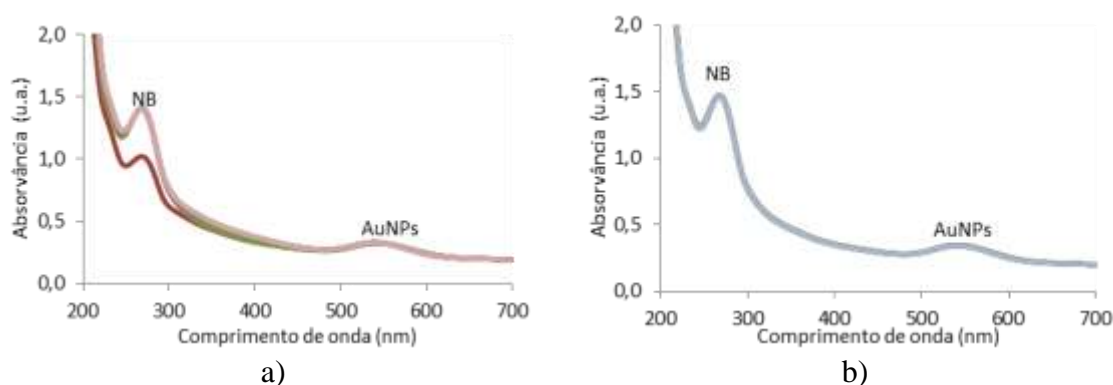


Figura 37 - Espectro UV-Vis da reação de redução do NB catalisado por AuNPs e utilizando como agente redutor a) hidrazina, b) trietilsilano.

II.2.4.3.2– Efeito de AuNPs obtidas com diferentes extratos de chá

Para esta reação também foram testadas como catalisador as 1% AuNPs/chá 2 (Figura 41), nas condições padrão. Verificou-se que estas AuNPs também promovem a reação, de um modo semelhante, às sintetizadas com o chá 1, e após 20 minutos de reação obteve-se 86,2% de conversão, praticamente não se alterando a partir desse momento.

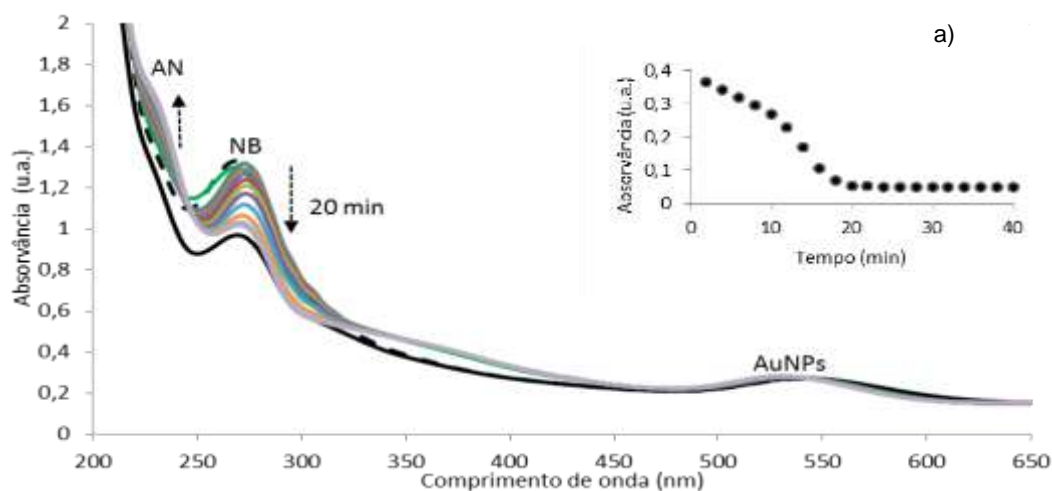


Figura 38 - Espectro UV-Vis da reação de redução do NB na presença de 1% AuNPs/chá 2. Condições reacionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4\text{-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 272 nm vs. tempo de reação.

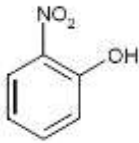
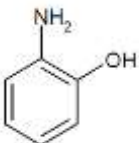
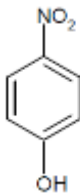
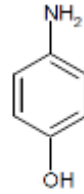
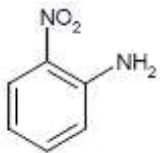
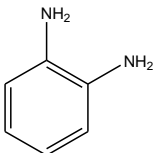
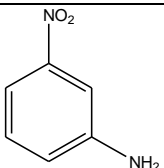
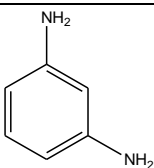

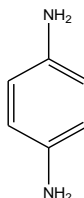
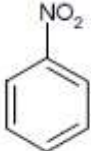
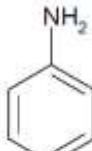
Pelos estudos efetuados é possível verificar que também para o NB as melhores condições são as condições padrão utilizadas para o 4-NF. Para o estudo de 1% AuNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá, verificou-se que para ambos os estudos, a conversão obtida foi muito semelhante (86,4% e 86,2%, para **chá 1** e **chá 2**, respectivamente), apesar de na presença de 1% AuNPs/**chá 1** essa conversão tenha sido obtida ao fim de um menor intervalo de tempo.

Na Tabela 8 apresenta-se um resumo dos diferentes resultados obtidos.

Em todos os casos estudados foi possível verificar que os compostos que apresentavam o grupo nitro na posição 4 (*para*) são mais suscetíveis a redução, que os seus isômeros orto ou meta substituídos, uma vez que foi possível obter maiores conversões com tempos de reação, em alguns casos, significativamente menores. Por exemplo, para o substrato nitrofenol, verificou-se que a posição 4- apresenta resultados mais favoráveis, uma vez que com o 4-NF se obteve uma conversão de 94% em 6 minutos, enquanto para o 2-NF foi obtida uma conversão de 80% em 8 minutos. No caso da 2- e 4-NA, foi observado que a 2-NA apresenta conversões maiores, no entanto a 4-NA demora menos tempo a atingir o valor da sua conversão final.

Para o sistema catalítico estudado, também se verificou que o nitrobenzeno é menos reativo do que o 4-NF, com o NaBH_4 , na presença da mesma quantidade de catalisador (AuNPs). Para este substrato foi possível obter uma conversão de 86%, ao fim de 14 minutos, no entanto verificou-se que mesmo ao fim de 40 minutos, a reação não se encontrava completa.

Tabela 8 – Redução de vários substratos utilizado como catalisador 1% AuNPs/chá 1.^a

Substrato	Produto	$k_{app} \times 10^2$ (min ⁻¹)	Tempo (min)	Conversão (%)
		23,2	8	80
(2-NF)	(2-AF)			
		41,6	6	94
(4-NF)	(4-AF)			
		17,3	8	84
(2-NA)	(2-FD)			
		2,5	8	50
(3-NA)	(3-FD)			
		37,8	4	78
(4-NA)	(4-FD)			
		4,6	14	86
(NB)	(NA)			

^aCondições reacionais: [1% AuNPs] = $4,3 \times 10^{-5}$ M; [substrato] = $3,8 \times 10^{-5}$ M; [NaBH₄] = $1,6 \times 10^{-3}$ M a 25 °C.^bTOF = TON por hora.

II.2.4.4– Reutilização das AuNPs na redução do 4-NF

Método 1

Para testar a reprodutibilidade/reutilização das 1% AuNPs/**chá 1**, como catalisador na redução de compostos nitro, o 4-NF foi utilizado como substrato modelo em dois métodos distintos. No primeiro método, a redução do 4-NF foi efetuada através da adição sequencial de substrato a uma solução aquosa contendo NaBH_4 e uma concentração constante de AuNPs (Figura 42). Como era expectável, as AuNPs tornaram-se menos eficientes após cada adição de substrato. Após a terceira adição de substrato (Figura 42c) e na presença do catalisador (AuNPs) inicial, ainda foi possível observar conversão completa do 4-NF a 4-AF, embora demorando mais tempo a completar a transformação (26 minutos), relativamente à segunda adição (10 min) (Figura 42b) ou aos 6 minutos da primeira adição (Figura 42a). Após a quarta adição de substrato (Figura 42d) observou-se que a conversão estagnou ao fim de 12 minutos. Contudo, após a adição do agente redutor (NaBH_4) observou-se uma diminuição da banda característica do ião 4-nitrofenolato, ocorrendo posteriormente conversão completa a 4-AF.

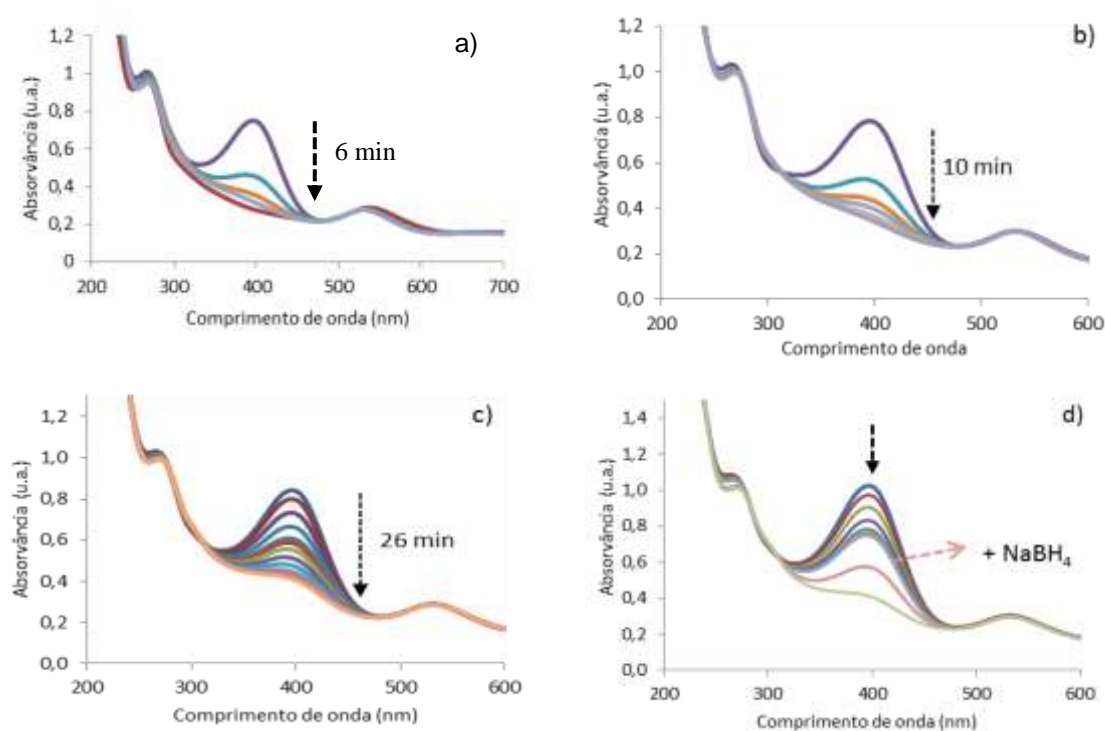


Figura 39 - Espectros UV-Vis da reutilização das 1% AuNPs/**chá 1** na redução do 4-NF. a) Primeira adição de 4-NF; b) Segunda adição do 4-NF; c) Terceira adição de 4-NF; d) Quarta adição de 4-NF e posterior adição de NaBH_4 . Todas as adições foram realizadas nas mesmas condições padrão (Condições reacionais: $[\text{AuNPs}] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{4-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.)

Por este método verifica-se que a percentagem de conversão nos vários ciclos testados é aproximadamente igual, apenas sendo necessária a adição de uma quantidade adicional de agente redutor ao fim do 4º ciclo (Figura 43). Após essa adição, verificou-se que a redução continuava a dar-se, com conversões similares às anteriores (mesmo um pouco maiores, pois tinha mais agente redutor), o que indica que as AuNPs utilizadas, ainda se encontram ativas após 4 ciclos. Com este estudo é perceptível que as AuNPs não apresentam desativação, sendo apenas necessário o controlo do substrato, que vai sendo consumido para formar o produto e do agente redutor, que também se vai esgotando.

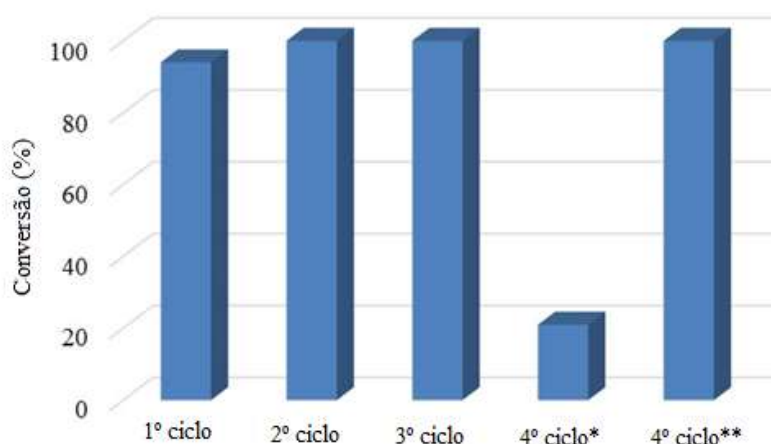


Figura 40 – Representação gráfica da conversão obtida com a reutilização das AuNPs, na redução do 4-NF, pelo método 1. * Antes de nova adição de NaBH_4 . ** Após nova adição de NaBH_4 .

Método 2

A capacidade de reutilização das AuNPs foi também estudada por um método que envolveu a separação das AuNPs da mistura, após a primeira reação de redução, por centrifugação. As AuNPs depositadas foram lavadas com etanol e secas. De seguida, adicionou-se água destilada (3 mL) às AuNPs isoladas e uma nova quantidade de 4-NF e de agente redutor (NaBH_4) de modo a apresentar as mesmas concentrações que a solução padrão ($[\text{4-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$) (Figura 44).

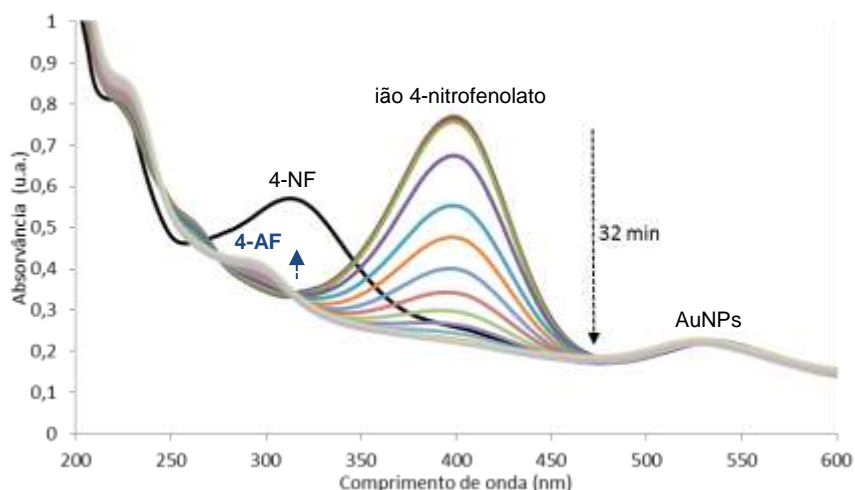


Figura 41 - Espectro UV-Vis da reutilização das AuNPs na redução do 4-NF, com base no segundo método. 1% AuNPs centrifugadas com adição de 4-NF (linha preta); adição do agente redutor (linha vermelha); scans de 2 em 2 min (restantes linhas decrescentes).

Neste método foi observada uma perda de atividade das 1% AuNPs na segunda reação, uma vez que a redução do 4-NF demora 32 minutos a ser completa, enquanto no primeiro método ocorre após 10 minutos (Figura 42b). Também se verificou que uma vez que a solução de chá foi removida após a centrifugação, as bandas características do 4-AF a 290 nm são agora visíveis e não mascaradas pelas bandas do extrato de chá. No entanto, a tendência para a formação de aglomerados, neste último método pode levar a uma redução da reatividade e estabilidade das NPs. Com a progressão da reação, é observado uma variação na banda característica das AuNPs, mas para c.d.o. mais baixos. A alteração pode ser devida ao agente redutor, que também reage com as AuNPs, promovendo a diminuição do seu tamanho.

A redução mais lenta do 4-NF pode estar relacionada com o facto de a solução de chá ter sido removida após o processo de centrifugação e consequentemente os polifenóis existentes nessa, os quais poderiam estar a promover a ação redutora.

A natureza heterogênea do processo catalítico também foi provada. Após o primeiro ciclo, as 1% AuNPs foram separadas a partir da mistura reacional final, por centrifugação. A solução sobrenadante também foi testada na reação de redução do 4-NF e não foi observada qualquer atividade (conversão do 4-NF a 4-AF). Além disso, a banda de absorção característica AuNPs não foi detetada, confirmando a inexistência de AuNPs na solução após centrifugação.

O uso de um nanocatalisador heterogêneo produzido por um processo “amigo do ambiente” ainda é um campo em desenvolvimento e, em comparação com outros estudos reportados, o catalisador apresentado neste trabalho parece ser mais ativo do que, por exemplo, um similar suportado em nanotubos de carbono de paredes múltiplas ou em alumina.¹¹⁰

II.2.4.5– Redução do Hexacianoferrato(III)

A redução do hexacianoferrato(III) a hexacianoferrato(II) pelos iões borohidreto (BH_4^-) (Equação 13)¹¹¹ em solução aquosa, foi outra reação estudada com o objetivo de avaliar a performance catalítica das AuNPs sintetizadas.^{55,112,113}



Esta reação eletroquímica é particularmente interessante e adequada para o presente estudo, considerando a estabilidade de ambos os estados de oxidação da espécie de ferro ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) as possíveis reações de dissociação ou de hidrólise e por também ser considerada uma reação modelo para a caracterização de catalisadores metálicos. O potencial redox da reação em estudo, E^0 ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) apresenta um valor de +0.44 V vs. ENH (Eléctrodo Normal de Hidrogénio), enquanto o potencial de redução normal para uma redução com iões BH_4^- é $E^0 = -1.24$ V vs. ENH, sendo portanto a variação da energia livre para esta reação muito elevada. Apesar da reação entre os iões $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e a superfície de certas NPs de platina (PtNPs) ter sido observada¹¹⁴, resultando na dissolução dos átomos de platina e consequentemente na redução do tamanho das PtNPs, não é de esperar qualquer reação química entre as AuNPs e o substrato.

Na ausência de catalisador esta reação é lenta (o tempo de meia vida ronda os 5000 s) e segue uma cinética de ordem zero.¹¹¹

Usando as mesmas condições reacionais que na redução dos compostos nitro, com exceção da concentração de substrato, as 1% AuNPs/**chá 1** ($4,3 \times 10^{-5}$ M) também catalisam a redução do hexacianoferrato(III) ($9,5 \times 10^{-4}$ M) na presença de iões BH_4^- ($1,6 \times 10^{-3}$ M). Como pode ser observado na Figura 45, o progresso da reação pode ser monitorizado através do decréscimo da intensidade da banda de absorção do hexacianoferrato(III) (a 420 nm) visível no espectro de ultravioleta-visível (UV-Vis), após adição do agente redutor BH_4^- . Para além disso, também foi possível constatar que durante a reação, não houve qualquer alteração na banda SPR das AuNPs ($\lambda = 538$ nm), o que confirma que estas se mantêm estáveis sem sofrer agregação durante o decorrer da redução do hexacianoferrato(III) a hexacianoferrato(II).

A redução completa dos iões $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foi obtida após ca. 20 minutos de reação. O tempo de reação, neste caso, é mais longo do que o observado no estudo realizado por Freund¹¹¹ que utilizaram AuNPs preparadas por ebulição da solução 5×10^{-4} M de HAuCl_4 na presença de uma solução $1,6 \times 10^{-3}$ M de citrato de sódio, durante 20 minutos, com um tempo total de reação de 50 segundos. Contudo, este último é efetuado com condições reacionais mais drásticas, nomeadamente envolvendo um meio muito alcalino com pH = 11,5 (para evitar a hidrólise do agente redutor) e usando uma maior concentração de borohidreto (1×10^{-2} M) em comparação com o sistema catalítico estudado no presente trabalho ($[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3}$ M).

Este maior tempo de reação pode dever-se à hidrólise dos iões BH_4^- em BH_3OH^- , que pode não ser negligenciável, uma vez que o Au apresenta uma boa capacidade para esta oxidação. Apesar de se usar um largo excesso de borohidreto em relação aos iões $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, não se pode ignorar a

possibilidade desta reação secundária de hidrólise ocorrer. Para além disso, a decomposição química do agente redutor pode ser fortemente inibida com condições experimentais que envolvam valores de pH elevados, tal como apresentado no trabalho apresentado por Freund¹¹¹ e outros¹¹⁵, no entanto, para ser possível a comparação desta reação, com a redução dos compostos nitro estudada anteriormente, optou-se por realizar o estudo em meio aquoso.

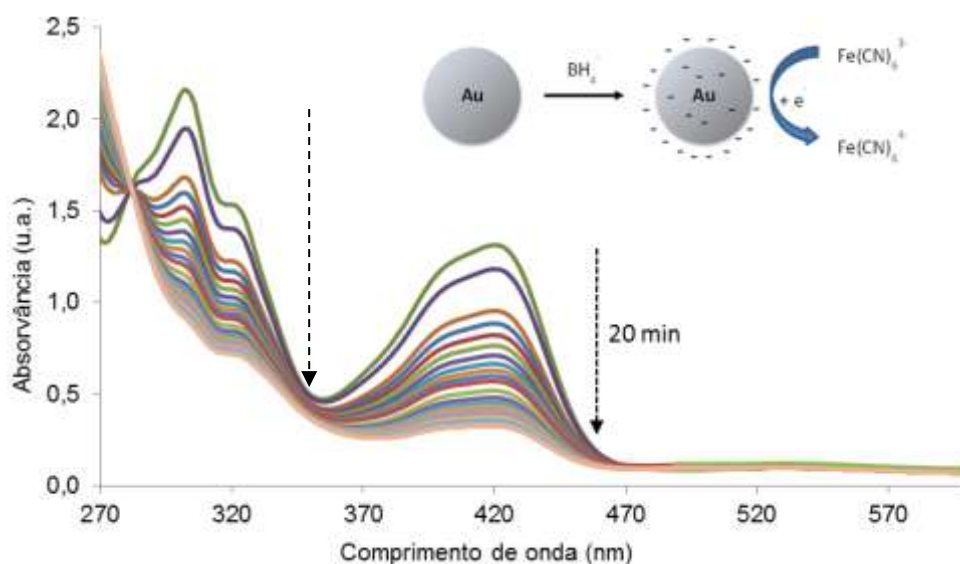


Figura 42 – Espectro UV-Vis da reação de redução dos iões $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ por NaBH_4 catalisada por 1% AuNPs/chá 1. Condições reacionais: $[\text{AuNPs}] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} = 9,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

II.2.5– ESTUDOS DE LIGAÇÃO AO ADN

No presente trabalho, os estudos biológicos efetuados, tiveram como objetivo avaliar a interação das NPs sintetizadas com o ácido desoxirribonucleico (ADN). O ADN é uma molécula biológica que possui vários centros disponíveis, para interagir com outros compostos. Essa interação poderá resultar numa modificação estrutural e consequentemente influenciar vários processos fisiológicos. Assim, os compostos capazes de interagir com o ADN, apresentam um elevado interesse terapêutico, uma vez que podem influenciar a supressão da replicação de genes ou da sua transcrição, podendo ser utilizados para destruir células tumorais ou tecidos infetados.

As interações de moléculas com o ADN alteram as propriedades físicas de ambos os compostos, que passam a formar um complexo de associação. Assim, o estudo das propriedades destes complexos pode ser útil de forma a avaliar o processo de interação e verificar o modo de ligação. Estas propriedades podem ser avaliadas através de técnicas que estudem a viscosidade, a temperatura de fusão e as propriedades de emissão e absorção dos complexos. Para estas últimas utilizam-se técnicas como a espectroscopia de UV-Vis, a espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular (CD).⁶³

II.2.5.1– Análise por Espectroscopia de UV-Vis

Foi estudada a capacidade das AuNPs se ligarem ao ADN de timo de vitela (*calf thymus DNA*, CT-DNA), através da medição dos efeitos da interação das AuNPs com o CT-DNA por espectroscopia de UV-Vis. A ligação de compostos com o ADN usualmente resulta na visualização da diminuição do valor de absorvância (hipocromismo) e de efeitos batocrómicos (deslocamento do comprimento de onda de absorção máximo para valores maiores). Isto surge pela forte interação das AuNPs e os pares de bases do ADN.¹¹⁶ Foram realizadas experiências de titulação das AuNPs numa solução tampão, monitorizadas por análises de espectroscopia de absorção, utilizando uma concentração fixa de AuNPs, às quais se adiciona, gradualmente, alíquotas de uma solução de ADN. A curva da titulação de AuNPs na presença e na ausência do CT-DNA, em diferentes concentrações, encontra-se demonstrada na Figura 46. A ligação das AuNPs ao ADN resultou na diminuição das intensidades da absorvância, com um desvio para a região do vermelho (desvio batocrómico) no espectro de absorção de UV-Vis (Figura 46). De modo a determinar a afinidade das AuNPs com o ADN, calcularam-se as constantes de ligação das AuNPs ao CT-DNA, através da monitorização do valor da absorvância ao comprimento de onda de 270 nm, com concentrações incrementais de ADN.

A extensão do hipocromismo dá uma medida da força da ligação por intercalação. A constante de ligação intrínseca de equilíbrio (K_b) das AuNPs ao ADN foi calculada como $3,74 (\pm 0,24) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($s = 0,34$), valor que segue a mesma ordem de grandeza que se observa numa tendência hipocrómica. O tamanho do local de ligação (s) para as AuNPs ($s < 1$) sugere uma ligação pelo sulco menor ou pelo sulco maior do ADN (groove binding) ou por agregação à superfície das AuNPs no ADN, em preferência à intercalação.¹¹⁷ O desvio batocrómico da banda espectral de $\sim 4 \text{ nm}$, sugere que as AuNPs provavelmente interagem com o CT-DNA através de um modo de intercalação parcial

e/ou pelo sulco menor. O valor da constante intrínseca de ligação (K_b) obtida para as AuNPs é da mesma ordem de grandeza (10^6) que o valor de K_b relatado para nanomateriais de ouro.¹¹⁸ O valor da constante de ligação observada pelos estudos da absorção espectral indica que as AuNPs se intercalam fortemente no núcleo do ADN, comparativamente com os seus homólogos comerciais. No entanto para que se tenha uma melhor caracterização da interação entre as nanopartículas e o ADN foi necessário recolher mais informação, através da análise da sua interação, por outras técnicas.

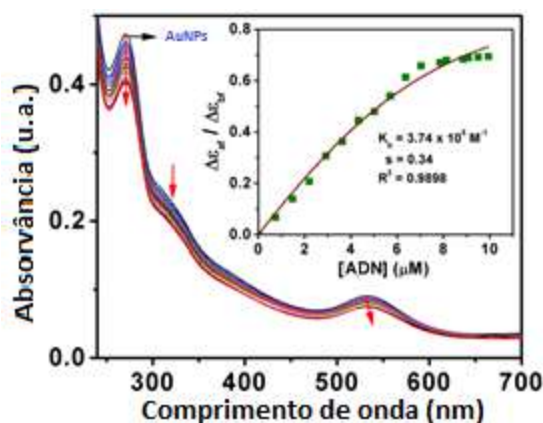


Figura 43 - Espectro de absorção das AuNPs (6,6 μ M) na ausência e na presença de quantidades incrementais de CT-DNA (0-10 μ M) em 5 mM da solução tampão de Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5). as setas indicam as mudanças da absorvância do complexo perante o aumento da concentração de CT-DNA. A figura inserida demonstra a variação de $\Delta\epsilon_{af} / \Delta\epsilon_{bf}$ versus [DNA] para as AuNPs.

II.2.5.2– Análise por Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica essencial para examinar as alterações na morfologia do ADN, devido às interações ADN-composto químico uma vez que os sinais de CD são sensíveis a pequenas alterações na conformação quiral do ADN.¹¹⁹ Por este motivo, foram registados os espectros de CD do CT-DNA (100 μ M), na solução tampão de 5 mM Tris-HCl / NaCl 50 mM (pH = 7,5) na presença de quantidades incrementais de AuNPs (Figura 47). O espectro observado do ADN apresenta uma banda positiva a 275 nm (UV; $X_{m\acute{a}x}$, 258 nm) devido ao emparelhamento das bases e uma banda negativa a 245 nm devido ao enrolamento da hélice do ADN, característica do ADN na forma B.¹²⁰ Com a introdução de AuNPs, verifica-se um aumento nas bandas positiva e negativa devido à transformação da conformação B do ADN, numa conformação semelhante à A.¹²¹ O resultado denota alterações drásticas induzidas pelas AuNPs, que indica a ocorrência de fortes alterações conformacionais na estrutura de dupla-hélice do ADN, devido à interação por intercalação,¹²² com as AuNPs.

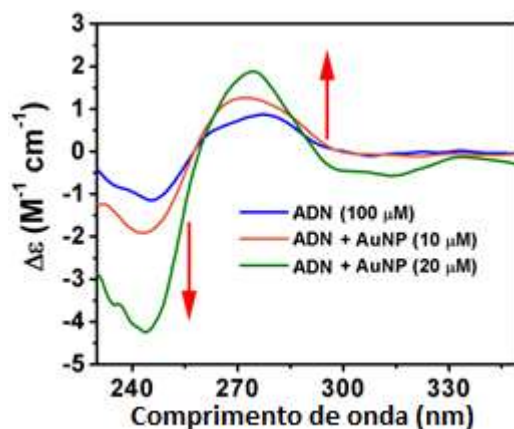


Figura 44 - Espectro de dicroísmo circular do CT-DNA, na presença de quantidades incrementais de AuNPs (0-20 μM) numa solução padrão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7.5). As setas indicam a tendência das alterações espectrais, com a adição de ADN.

II.2.5.3– Análise por Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica muito eficaz para investigar a afinidade de ligação de compostos químicos com a molécula de ADN. Assim, foram examinadas soluções contendo CT-DNA e brometo de etídio (BE) por titulação com AuNPs.

O BE é considerado um sensor fluorescente extremamente sensível, que se pode ligar ao ADN. Na presença de ADN, este emite fluorescência de forma intensa a aprox. 600 nm, devido à forte interação entre os pares de bases do ADN.¹²³ A disposição do ADN intercalado por moléculas de BE tem sido usada como padrão para testar agentes de ligação ao ADN. A adição de uma segunda molécula, que se liga ao ADN mais fortemente do que o BE, iria extinguir a fluorescência da ligação BE-DNA, ou por substituição do BE ou através da aceitação do eletrão no estado excitado de BE, através de um mecanismo de transferência de fotoeletrões.¹²⁴

Foi efetuada a análise por titulação competitiva da fluorescência, das AuNPs *versus* BE ligado ao CT-DNA, na solução tampão 5 mM Tris-HCl / NaCl 50 mM. Prevê-se que as AuNPs estudadas compitam com o BE intercalante, pelos locais de intercalação do ADN, pelo mecanismo de substituição do BE.¹²⁴

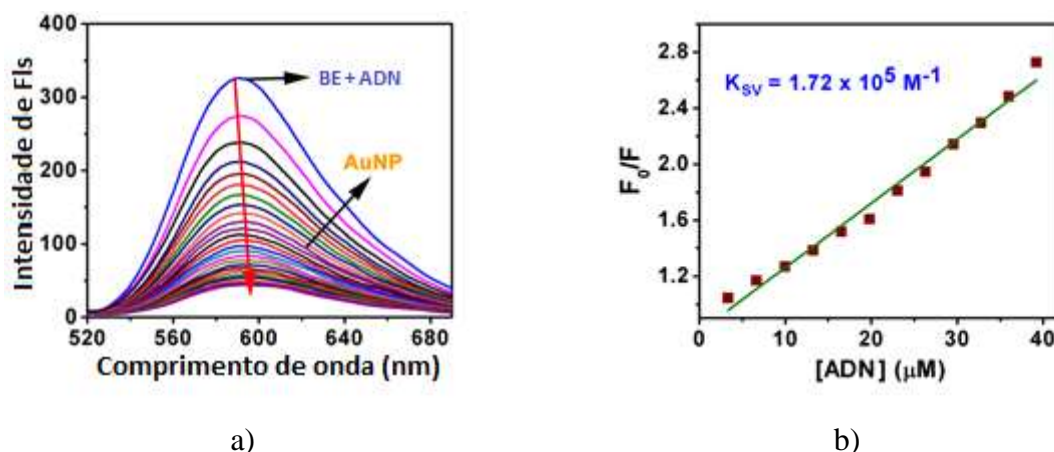


Figura 45 - Espectro de emissão de brometo de etídio (BE) ligado ao ADN na solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5), na ausência e na presença de AuNPs. [BE] = 3,3 μ M, [DNA] = 40 μ M, [AuNPs] = 0-80 μ M. (λ_{ex} = 510 nm). Gráfico de F_0/F versus [AuNPs] para a curva de extinção da fluorescência do ADN-BE, pelas AuNPs.

A extinção da fluorescência do BE ligado ao CT-DNA, pelas AuNPs, é apresentada na Figura 48. O espectro de extinção da fluorescência demonstra que, com o aumento da concentração de AuNPs, a banda de emissão a 590 nm sofre uma diminuição do valor de absorção (hipocromismo) de 86,8%, em comparação com a intensidade de fluorescência inicial (na ausência de AuNPs). Esta diminuição da intensidade da fluorescência revela claramente que as AuNPs se ligam competitivamente com o BE ao CT-DNA. A constante de extinção de Stern-Volmer (K_{SV}) foi calculada como $1,72 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($R^2 = 0,984$). Isto também demonstra que a substituição parcial do BE ligado ao ADN, pelas AuNPs resulta num decréscimo da intensidade de fluorescência.

A concentração de AuNPs que resulta numa redução de 50% da intensidade de emissão de BE¹²⁵ pode ser obtida a partir da Figura 48. Assim, é possível verificar que 50% de moléculas de BE foram substituídas da sua ligação com o ADN para uma razão de concentração $\frac{[AuNPs]}{[BE]} = K_1$, onde o valor de K_1 para as AuNPs é de 7,97. Sabendo que a constante de ligação do ADN para o BE ($K_B(\text{BE})$) é $1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, a constante aparente de ligação do ADN para as AuNPs ($k_{app} = 1,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) foi obtida a partir da equação $\frac{K_B(\text{BE})}{K_1}$. O valor de k_{app} implica que AuNPs interagem eficientemente com o ADN, pois o ambiente hidrofóbico dentro da hélice do ADN possivelmente reduz a acessibilidade de moléculas de água às AuNPs e a sua mobilidade é restrita ao local da ligação.¹²⁶

II.2.5.4– Análise por Viscosidade

O modo de ligação das AuNPs ao ADN foi adicionalmente verificado por medições de viscosidade. O modo de intercalação clássica provoca um aumento significativo na viscosidade da solução de ADN, devido ao aumento da separação dos pares de bases, nos locais de intercalação e, consequentemente, provoca um aumento no comprimento do ADN.

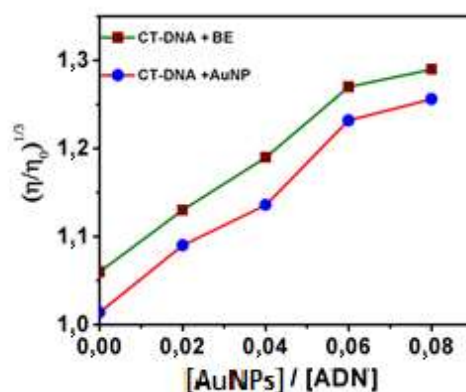


Figura 46 - Efeito de quantidades incrementais de BE e AuNPs, na viscosidade relativa do AND-CT a 25 ($\pm 0,1$) °C. Concentração final de ADN de 0,5 mM.

Como demonstrado na Figura 49, os valores de viscosidade específica relativa (η / η_0), onde η e η_0 são as viscosidades específicas de ADN na presença de um aumento da razão [AuNPs] / [DNA], entre 0,02 e 0,08. As AuNPs exibem uma tendência de aumento da viscosidade relativa, o que sugere fortemente que a intercalação é o principal modo de ligação, quando estas interagem com o CT-DNA. Este aumento, no entanto, é menor do que para o intercalador BE.¹²⁷ O aumento significativo na viscosidade das AuNPs é devido à inserção parcial das AuNPs entre os pares de bases do ADN, levando a um aumento da sua separação, no local de intercalação e consequentemente, a um aumento geral do comprimento do contorno do ADN.¹²⁸ O comprimento da parte linear do ADN na conformação B é determinado pela espessura dos pares de bases que estão empilhados por forças de Van der Waals, entre si, ao longo do eixo da hélice. Este resultado sugere que as AuNPs conseguem ligar-se fortemente ao ADN por intercalação, tal como o composto BE.

II.2.6– ESTUDOS DE LIGAÇÃO A PROTEÍNA

Para além do estudo efetuado do mecanismo de ligação das AuNPs ao ADN, também se estudou a interação das AuNPs sintetizadas com a albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*, BSA), que é a proteína mais abundante no sangue bovino e possui uma estrutura muito semelhante à albumina do soro humano (*Human Serum Albumin*).¹²⁹ A interação de compostos com proteínas pode resultar na formação de compostos estáveis, que podem ter importantes implicações em alguns processos fisiológicos e na atividade biológica, uma vez que a albumina é uma proteína de transporte multifuncional, que está envolvida em vários e importantes processos fisiológicos.⁶⁷

II.2.6.1– Análise por Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta muito útil para projetar as interações de ligação entre a BSA e outros compostos químicos. Assim, é muito útil para se obter informação sobre as mudanças conformacionais e dinâmicas na estrutura da proteína. A diminuição da intensidade de fluorescência da BSA ocorre principalmente pela formação de um complexo entre o agente que extingue a fluorescência (aqui as AuNPs) e a proteína BSA que contém fluoróforos,¹³⁰ tais como resíduos de triptofano, o Trp-134 e Trp-212. A intensidade de emissão depende da exposição dos resíduos de triptofano ao ambiente polar das proximidades e a grupos de extinção como carbonilos protonados, grupos indole e iões tirosinato, através de interações moleculares.¹³¹ No presente trabalho estudou-se a capacidade das AuNPs se ligarem à proteína BSA sob condições fisiológicas.

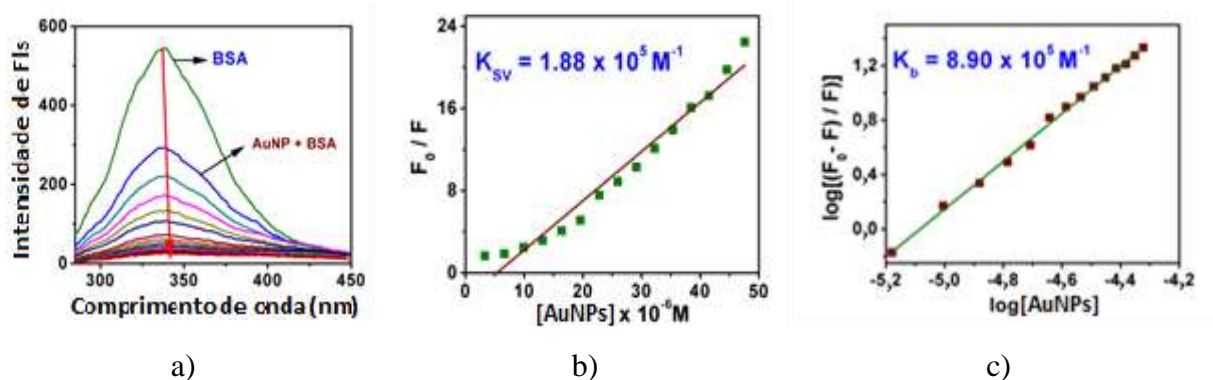


Figura 47 - (a) Alterações visualizadas no espectro de fluorescência da BSA (1,0 μM) com o aumento da concentração de AuNPs (0-40 μM), na solução tampão 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5) (λ_{ex} = 280 nm). (b) Gráfico da relação não-linear de Stern-Volmer de I_0/I vs. [AuNPs]. (c) Representação gráfica da relação de Scatchard de $\log\left(\frac{I_0-I}{I}\right)$ vs. \log [AuNPs].

O efeito das AuNPs na intensidade de fluorescência de BSA é mostrado na Figura 50, a partir da qual se pode ver que a BSA tem uma forte banda de emissão de fluorescência a ca. de 335 nm, quando a amostra é excitada a 280 nm. Pela figura é possível verificar ainda que a intensidade de fluorescência da BSA é drasticamente reduzida com a adição das AuNPs. A adição das AuNPs à solução de BSA resulta na extinção da sua emissão de fluorescência, com um desvio para o vermelho significativo (~ 3 nm), possivelmente devido a mudanças na estrutura secundária/terciária da BSA no tampão fosfato, afetando a orientação dos resíduos de triptofano da BSA. Esta variação no pico de fluorescência característico da BSA indica a interação entre BSA e as AuNPs. O valor de K_{SV} (constante de Stern-Volmer) do complexo foi calculado como $1,88 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a partir da equação de Stern-Volmer não-linear.

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q]) \quad (14)$$

A equação de Scatchard foi usada para calcular o número de locais de ligação (n) e a constante de ligação (K_b) de equilíbrio, como mostrado abaixo:

$$\log\left(\frac{I_0 - I}{I}\right) = \log K_b + n \log[Q] \quad (15)$$

O valor de K_b foi determinado a partir do declive do gráfico de $\log\left(\frac{I_0 - I}{I}\right)$ vs $\log[AuNPs]$. Com base no gráfico, o valor de n para o ligando e para o complexo foi calculado como sendo ~ 1, o que fortemente sugere a existência de um único local de ligação na proteína BSA. O K_b para as AuNPs foi calculado como sendo $8,90 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, este valor sugere que as AuNPs interagem fortemente com BSA.

II.2.6.2– Análise por espectroscopia de absorção para a BSA

A espectroscopia de absorção é uma importante ferramenta para determinar o tipo de extinção de fluorescência. Os mecanismos são geralmente classificados como extinção dinâmica ou estática. Para um mecanismo de extinção dinâmica, o espectro de absorção do fluoróforo não é alterado, e apenas o estado excitado do fluoróforo é influenciado pelo composto responsável pela extinção, enquanto, para a extinção estática, um novo composto é formado entre o estado fundamental do fluoróforo e o composto de extinção e, por conseguinte, o espectro de absorção do fluoróforo seria significativamente alterado.¹³²

O espectro de absorção da BSA na ausência ou na presença de AuNPs é apresentado na Figura 51. Curiosamente, as AuNPs provocam uma melhoria significativa (~ 4,8 vezes de aumento) com um significativo deslocamento para o azul (~ 3 nm), o que revela a existência de uma interação estática entre a proteína BSA e as AuNPs.¹³³

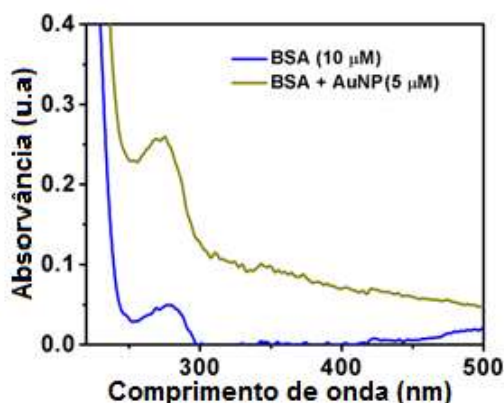


Figura 48 - Espectro de absorção UV-Vis da BSA na ausência e na presença de AuNPs na solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl (pH = 7,5).

II.2.6.3– Análise conformacional da BSA

As mudanças conformacionais da BSA foram examinadas através da medição síncrona da intensidade de fluorescência dos seus fluoróforos, como os resíduos de tirosina (Tyr) ($\Delta\lambda = 15$ nm) ou triptofano (Trp) ($\Delta\lambda = 60$ nm).¹³⁴ O espectro é obtido através da análise simultânea de monocromadores de excitação e de emissão, mantendo o comprimento de onda constante ($\Delta\lambda = 15$ ou 60 nm) entre eles.¹³⁵ Os espectros de fluorescência síncrona da BSA, com concentrações variáveis de AuNPs, adquiridos para $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm são apresentados na Figura 52. O teste efetuado para $\Delta\lambda = 15$ nm, com quantidades variantes de AuNPs apresenta um decréscimo na intensidade de fluorescência da banda a 287 nm (94 %) com um significativo desvio para o vermelho de 16 nm, o que indica que os complexos têm um efeito muito forte no microambiente dos resíduos de Tyr. O desvio para o vermelho, significa um decréscimo do microambiente hidrofóbico e um aumento do hidrofílico dos resíduos Tyr da BSA. Do mesmo modo, a intensidade da fluorescência síncrona da BSA para $\Delta\lambda = 60$ nm, com quantidades incrementais de AuNPs, diminui dramaticamente como visualizado para a banda a 280 nm (98 %) com um deslocamento significativo para o azul de 21 nm, o que indica que a conformação da BSA foi alterada de tal modo que a polaridade em torno dos resíduos de Trp diminui e a hidrofobicidade aumenta.¹³⁶

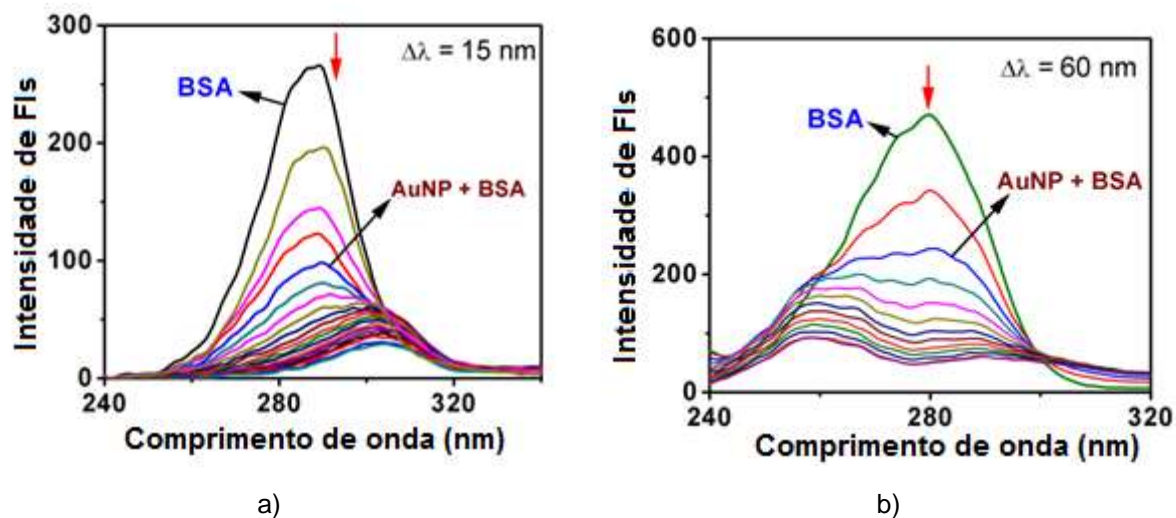


Figura 49 - Espectros de fluorescência síncrona da BSA na solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl, pH = 7,5, na presença de quantidades incrementais de AuNPs (0–50 μ M), a diferentes comprimentos de onda de: a) $\Delta\lambda = 15$ nm b) $\Delta\lambda = 60$ nm. As setas demonstram a diminuição da intensidade com o aumento da concentração de AuNPs.

II.3– NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

II.3.1– SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs), foram utilizados diferentes extratos de chá com concentração de 1% (Tabela 1), de forma a estudar a sua influência na morfologia e consequentemente no seu desempenho catalítico. Foram ainda aplicados diferentes métodos de síntese das AgNPs, além do método simples, nomeadamente métodos envolvendo irradiação de microondas (MW) e ultrassons (US).

II.3.1.1– Método Simples (MS)

No método simples, a formação das AgNPs pode ser observada pela alteração da cor da solução, que inicialmente se apresenta de cor amarela, devido ao extrato de chá, adquirindo posteriormente uma tonalidade acastanhada, indicando a formação de AgNPs (Figura 53). A formação de AgNPs é consideravelmente mais lenta (ca. 3h), comparativamente às AuNPs preparadas nas mesmas condições reacionais. A síntese das AgNPs preparadas com extratos de **chá 5** e **6** foram as mais lentas.

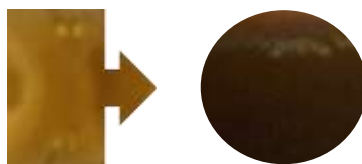


Figura 50 - Imagens do **chá 1**, antes e após a formação de AgNPs (1% AgNPs/**chá 1**).

Foi utilizada a técnica de espectroscopia UV-Vis, para confirmar a formação de AgNPs, através da observação das bandas características de SPR das AgNPs na região do visível, que varia consoante o tamanho das NPs sintetizadas.

II.3.1.2– Síntese por irradiação Microondas (MW) e Ultrassons (US)

Investigou-se o efeito da aplicação de irradiação MW e US na síntese de AgNPs com o objetivo de encontrar técnicas alternativas e “amigas do ambiente” que permitam melhorar o processo, nomeadamente no que diz respeito ao tempo de reação. Neste caso, o procedimento de

síntese das AgNPs é semelhante ao método simples, no entanto, a reação de redução da Ag^+ (na forma de AgNO_3) na presença de extrato de chá é realizado com agitação sob irradiação de microondas ou imerso num banho de ultrassons, até à mudança de cor da solução. No final todas as soluções se apresentavam acastanhadas, variando apenas na intensidade da cor.

A síntese de AgNPs por US revelou ser a mais demorada e novamente os extratos dos **chás 5 e 6** contribuíram para o prolongamento do tempo de síntese.

A técnica MW foi utilizada a 35 °C e a 150 °C na presença de extratos de **chá 1 e 2**. A técnica MW a 35 °C tinha como objetivo aproximar as condições reacionais às utilizadas no método simples (temperatura ambiente). No entanto, verificou-se que para 35 °C o tempo de síntese das AgNPs continuava a ser muito longo (Figura 54) e nesse campo, este método e nestas condições, não apresentava vantagens comparativamente ao método simples (MS). Quando a temperatura foi aumentada para 150°C observou-se a formação de AgNPs em menos de 1 minuto. A variação dos métodos de síntese e condições experimentais traduzem-se em variações do tamanho e da dispersão das NPs sintetizadas.

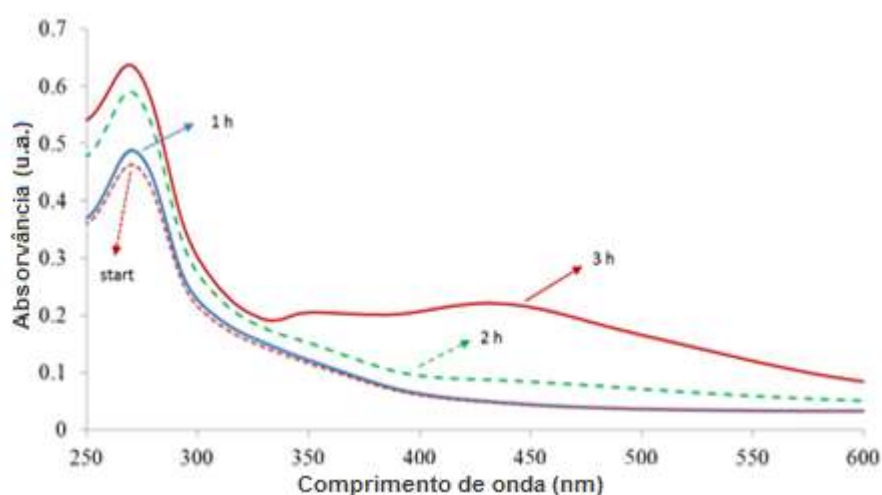


Figura 51 – Espectro UV-Vis de diferentes tempos na síntese de 1% AgNPs/**chá 1**, assistida por radiação microondas.

II.3.2– CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

À semelhança das AuNPs, as AgNPs sintetizadas a partir de diferentes extratos de chá foram caracterizadas usando técnicas como a espectroscopia de UV-Vis, difração de raio-X, microscopia eletrônica de varrimento (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), e espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDS), de forma a ser possível obter informação sobre a sua forma, tamanho, morfologia, dispersão e composição das amostras.

II.3.2.1– Métodos Espectroscópicos

Espectroscopia de UV-Vis

Foi utilizada a técnica de espectroscopia UV-Vis, para confirmar a formação de AgNPs, através da observação das bandas características de SPR das AgNPs na região do visível, que varia consoante o tamanho e a forma das NPs sintetizadas, ocorrendo numa região de comprimento de onda (c.d.o.) de 350 a 550 nm¹³⁷. Para partículas não esféricas, é possível visualizar duas ou mais bandas SPR. Por outro lado, a largura das bandas está relacionada com a distribuição dos tamanhos das NPs, enquanto o c.d.o. máximo da banda SPR está relacionado com o tamanho médio das NPs, sendo que c.d.o. maiores são indicativos de NPs maiores.^{138,139} Nesse sentido, verificou-se que o tamanho das NPs variava consoante o extrato de chá e método sintético utilizados. A Figura 55 apresenta as bandas SPR características, para as AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá. Pela representação é possível verificar que as bandas assumem formas bem distintas, onde o c.d.o. máximo de absorção da banda característica, também varia significativamente (Tabela 9). Para a maioria dos extratos é detetada uma banda secundária, para valores de c.d.o. mais baixos. Por este estudo, verifica-se que por vezes essa segunda banda é maior que a banda SPR característica das AgNPs, que ronda os 400 nm, e que outras bandas são muito largas, indiciando uma elevada dispersão do tamanho das NPs. As AgNPs que apresentam as bandas SPR mais definidas são aquelas obtidas pelo método simples utilizando extrato de **chá 1**, indicando que estas possuem maior uniformidade.

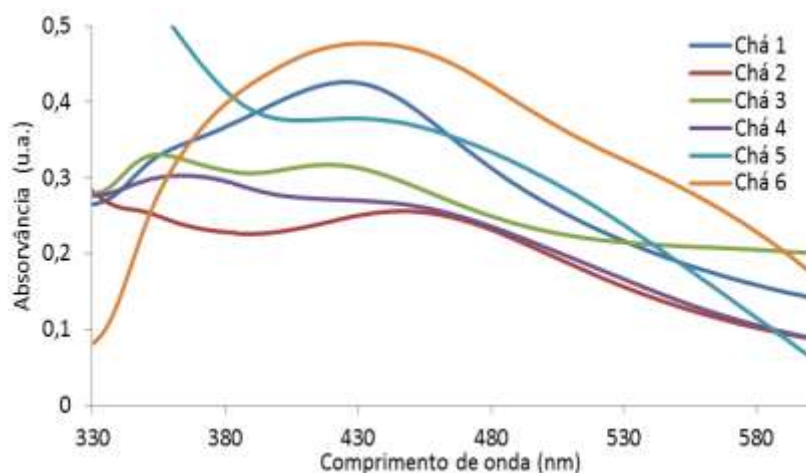


Figura 52 - Bandas SPR obtidas por espectroscopia de UV-Vis das AgNPs sintetizadas pelo método simples, utilizando diferentes extratos de chá.

Tabela 9 - Valor máximo do comprimento de onda da banda SPR, obtido pela análise de UV-Vis, para as AgNPs sintetizadas por diferentes extratos de chá.

	c.d.o. da banda SPR (nm)	c.d.o. da banda secundária (nm)
Chá 1	426	357
Chá 2	449	354
Chá 3	419	353
Chá 4	456	364
Chá 5	428	-
Chá 6	448	-

As AgNPs produzidas por diferentes métodos apresentam variações no tamanho e sua dispersão, sendo essas diferenças visíveis por análise de espectroscopia de UV-Vis (Figura 56 para AgNPs sintetizadas com os **chás 1 e 2**, restantes estão representadas no Anexo D). Verifica-se que pelo método simples e utilizando o **chá 1** se obtêm AgNPs mais uniformes, com uma banda SPR mais definida no seu espectro de UV-Vis, comparativamente às AgNPs obtidas pelos outros métodos (MW e US), inclusive AgNPs comerciais (redução com citrato) (Figura 56a).

Para a AgNPs obtidas com o extrato do **chá 2**, as bandas SPR apresentam valores máximos, a comprimentos de onda distintos, consoante o método, indicando que os tamanhos das AgNPs são distintos. As AgNPs obtidas por irradiação de MW a 150°C apresentam uma banda SPR mais definida relativamente aos outros processos e parecem mesmo possuir tamanhos menores, uma vez que a banda SPR é visualizada em comprimentos de onda menores.

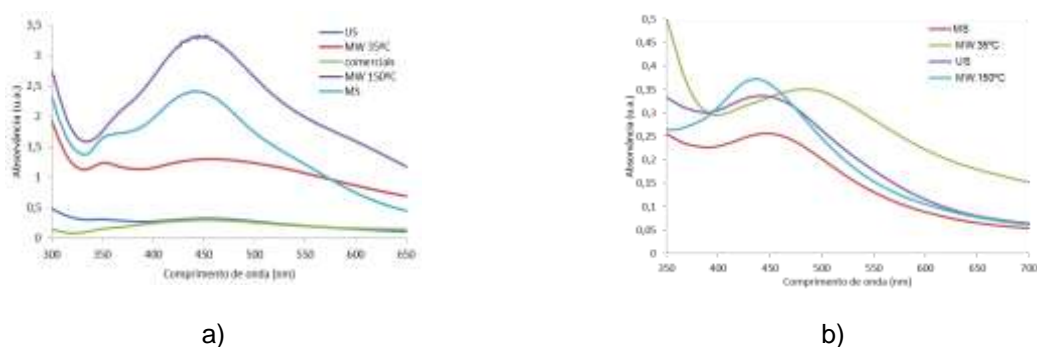


Figura 53 - Espectros de UV-Vis das bandas das AgNPs formadas através de diferentes métodos a) 1% AgNPs/**chá 1**; b) 1% AgNPs/**chá 2**.

Difração de Raios-X

A análise estrutural das AgNPs foi efetuada usando a técnica de difração de raios-X (Figura 58). No difractograma obtido, são visíveis os padrões da estrutura cristalina característica da prata com conformação cúbica de faces centradas (JCPDS file No. 04-0783). Os picos de difração a 2θ valores de 38,24, 44,42, 64,44, 77,40° podem ser associados à reflexão dos planos (111), (200),

(220), (311) da prata cúbica de faces centradas, respectivamente. Não foram detetados picos de outras fases, indicando um elevado nível de pureza dos produtos.

O pico de Bragg correspondente ao plano (1 1 1), indica que as nanopartículas expostas predominantemente às faces cristal {1 1 1}, característica marcada pelo aumento da relação entre iões Ag^+ e o extrato de chá.

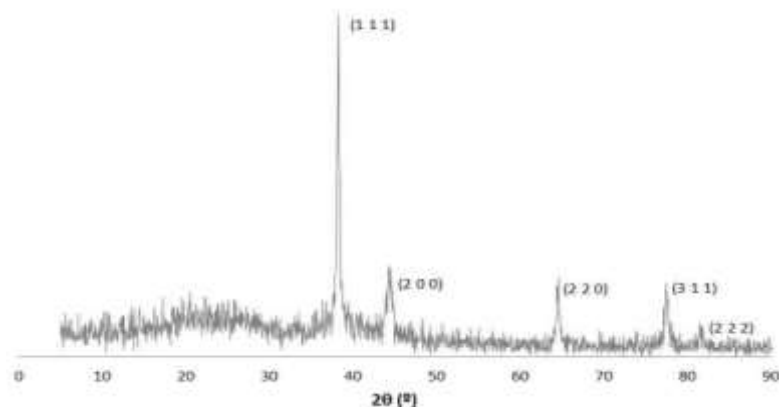


Figura 54 – Difractograma da análise XRD de uma amostra de 1% AgNPs.

II.3.2.1– Métodos Microscópicos

Microscopia electrónica de transmissão

A análise de imagens TEM das 1% AgNPs formadas com extratos de **chá 1** e **2**, bem como os respetivos histogramas (Figura 59) permitiu concluir sobre o tamanho das NPs formadas.

As 1% AgNPs/**chá 1** são esféricas com diâmetros que variam entre 10-40 nm enquanto as 1% AgNPs/**chá 2** são triangulares com diâmetros que variavam entre os 33-46 nm.

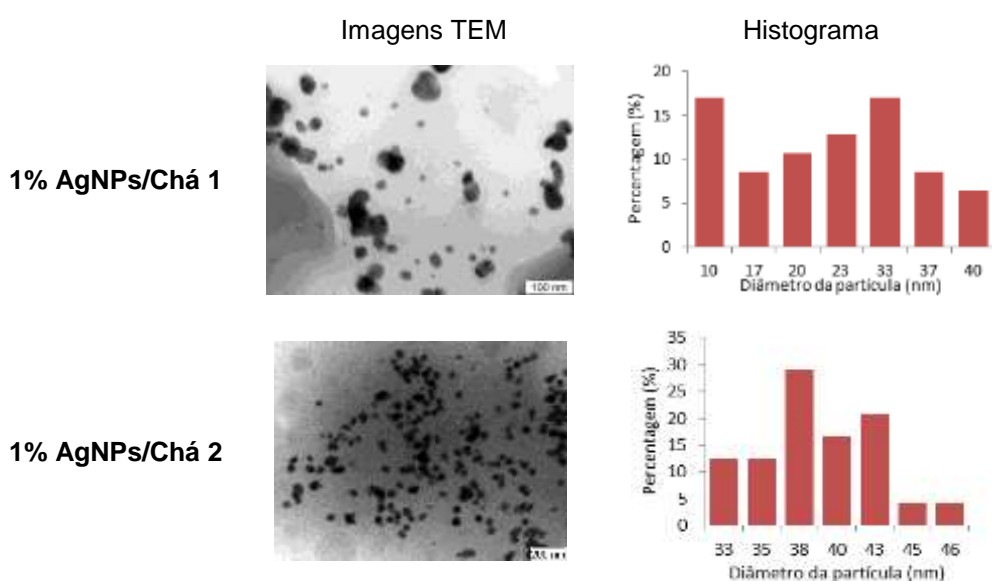


Figura 55 - Imagens da técnica TEM e distribuição do tamanho das partículas para 1% AgNPs obtidas com a) **chá 1** e b) **chá 2**.

A Figura 60 permite, através dos histogramas obtidos a partir de imagens TEM, comparar o tamanho das AgNPs produzidas com diferentes extratos de chá, pelos diferentes métodos sintéticos (MS, MW e US). Para o **chá 1**, verifica-se que com o método de MW, o tamanho médio das NPs é menor em comparação com as NPs obtidas pelo método simples, e que a dispersão dos tamanhos continua a não ser elevada, tal como verificado para o método simples. Para as AgNPs produzidas pelo método US, verifica-se que o tamanho principal é bem menor, no entanto a dispersão (de tamanhos) é maior. Para o **chá 3**, verifica-se que o método simples é o que apresenta tamanhos médios mais pequenos, a dispersão por tamanhos é maior, que no método MW, que se centram primordialmente em apenas dois tamanhos. Pelas imagens obtidas pela técnica TEM deste chá (Anexo E entrada 5, 6 e 7) verifica-se que a dispersão das AgNPs é boa para os métodos simples e MW, mas não para o método US. Com o **chá 4**, verifica-se que pelo método MW se obtém um tamanho médio muito mais pequeno, no entanto apresenta ainda uma considerável dispersão de tamanhos, tal como verificado para o método US. Pelas imagens obtidas (Anexo E, entrada 8, 9 e 10) verifica-se que a dispersão das AgNPs sintetizadas pelo método simples é boa, piorando com o método MW e US. Para o **chá 5**, com o método simples, o tamanho principal é muito pequeno, apresentando uma baixa dispersão de tamanhos. As AgNPs sintetizadas pelos outros métodos, encontravam-se aglomeradas e com tamanhos superiores a 100 nm, impossibilitando a determinação do seu tamanho, por esta técnica. Este facto pode ser devido à qualidade da amostra, na altura análise e possivelmente influência da secagem efetuada (estas amostras foram secas na estufa e esta mistura de chá, de onde foi retirado o extrato, era a única que se apresentava como solúvel e não na forma de folhas. A amostra pelo método simples foi seca ao ar.). Para este caso, mais estudos têm de ser realizados. Para o **chá 6** verifica-se que as AgNPs sintetizadas pelo método simples apresentam uma elevada dispersão de tamanhos, apresentando no entanto uma gama mais restrita de tamanhos principais (18 nm e cerca de 35 nm). Para o método MW verifica-se que os tamanhos são muito mais dispersos (existem muitas nanopartículas com diferentes tamanhos). Para o método US verificam-se principalmente NPs com tamanhos mais pequenos.

As AgNPs sintetizadas com o **chá 2**, pelos métodos MW e US não foram estudadas por TEM ou SEM, por apresentarem atividades catalíticas baixas, para as aplicações estudadas, e indistintas das preparadas pelo método simples.

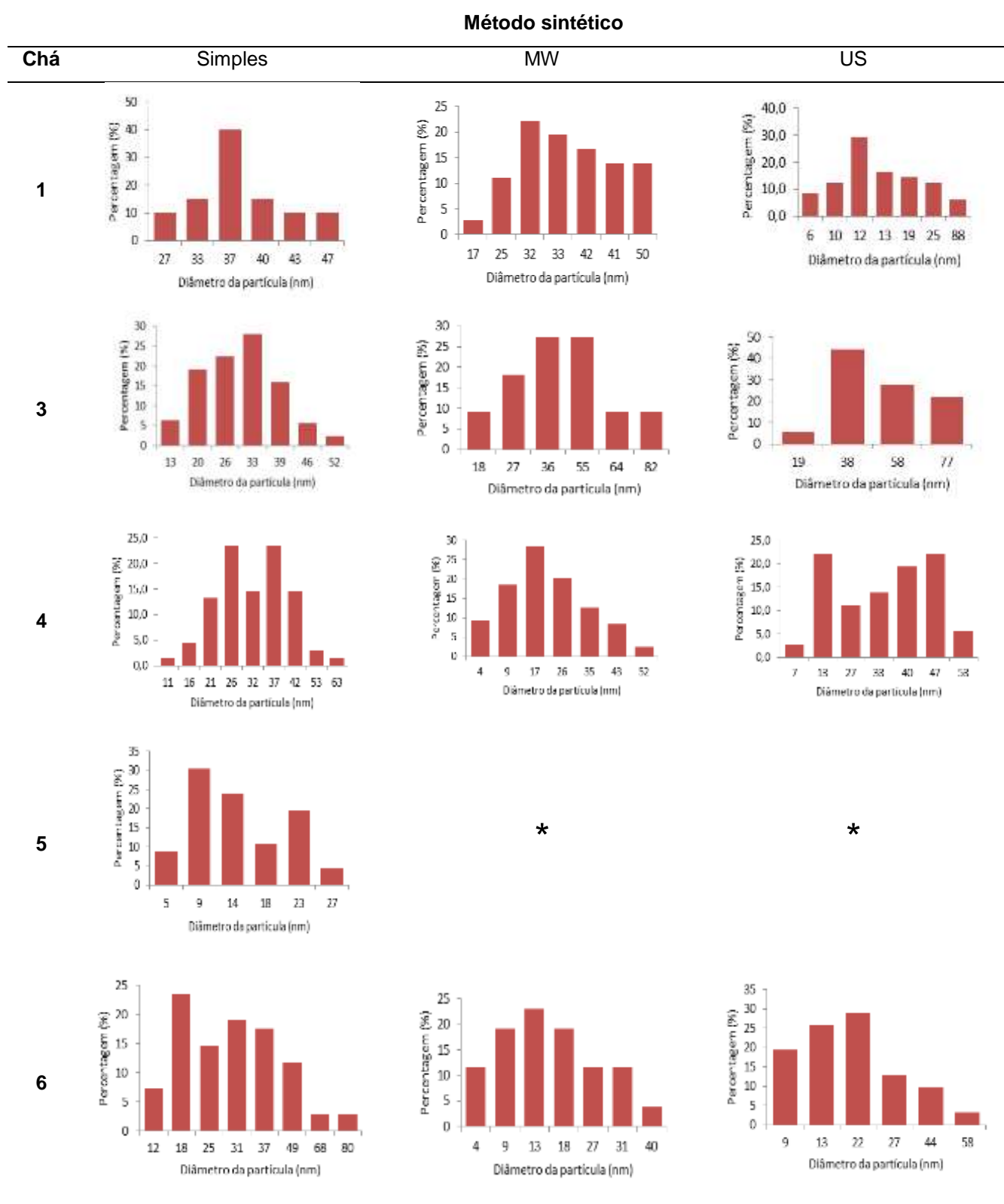


Figura 56 - Distribuição do tamanho das partículas para os diferentes extratos de chá (1%), sintetizadas pelos diferentes métodos (simplex, microondas (MW) e ultrassons (US)). *As amostras quando analisadas por TEM apresentaram aglomerados com tamanhos superiores a 100 nm, impossibilitando a determinação do seu tamanho, por esta técnica.

Pretendeu-se estudar o efeito da radiação microondas na velocidade de síntese das AgNPs e nas suas propriedades. Para tal, foram preparadas AgNPs sob radiação MW a duas temperaturas. Pelo estudo efetuado verifica-se que para temperaturas elevadas no método de MW, se traduzem em valores de potência maiores. Assim, pelos dados obtidos, verifica-se o tamanho principal das nanopartículas produzidas pelo método MW com temperaturas de 35 °C, é bem maior e apresentam uma maior contribuição de nanopartículas com maior diâmetro. Para este método, no entanto verifica-se que a distribuição de tamanhos é menor, sendo que as partículas se encontram na gama dos 17 aos 50 nm, enquanto para o MW a 150 °C a gama é dos 5 aos 78 nm. Para o método MW a 150 °C verifica-se uma maior dispersão de tamanhos, no entanto também se verifica que o tamanho maioritário é muito pequeno (10 nm).

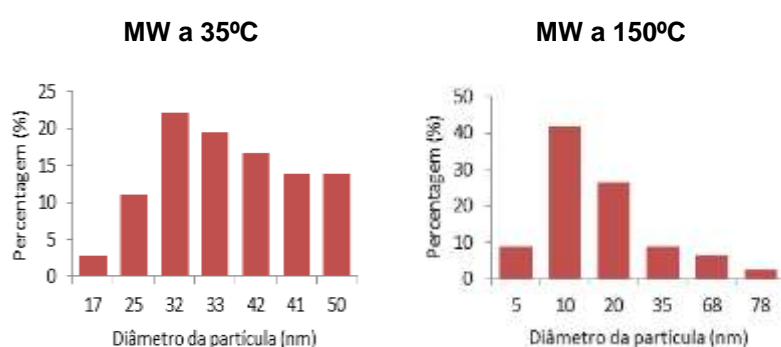


Figura 57 – Distribuição dos tamanhos das 1% AgNPs/**chá 1** pelo método MW a 35°C e 150°C.

Com os dados obtidos também foi possível verificar que, utilizando o método MW à temperatura de 35 °C se observou a formação de AgNPs mais uniformes relativamente às obtidas por US. Aumentando a energia de microondas de 3 para 120 W resultou num decréscimo do tamanho da AgNPs produzidas (Figura 61a e b). Isto é provavelmente devido ao facto de que energias mais elevadas promoverem a geração de mais núcleos de menores dimensões.

Microscopia electrónica de varimento e transmissão raio-X de energia dispersiva

A técnica SEM tem sido utilizada na caracterização da morfologia da superfície, após a imobilização de NPs e para determinar a forma e distribuição das AgNPs. Esta técnica foi utilizada para estudar as NPs produzidas através de diferentes extratos de **chá 1** e **2** (Figura 62) utilizados também na síntese de AuNPs, bem como os extratos de **chá 3 – 6** (Anexo E).

A presença de AgNPs foi confirmada por análise de EDS (Figura 64) e para alguns casos também é perceptível a sua presença, pela utilização do detetor de eletrões retrodifundidos onde os materiais com maior densidade eletrónica (como os metais), fazem maior contraste, tomando uma aparência mais brilhante (Figura 63).

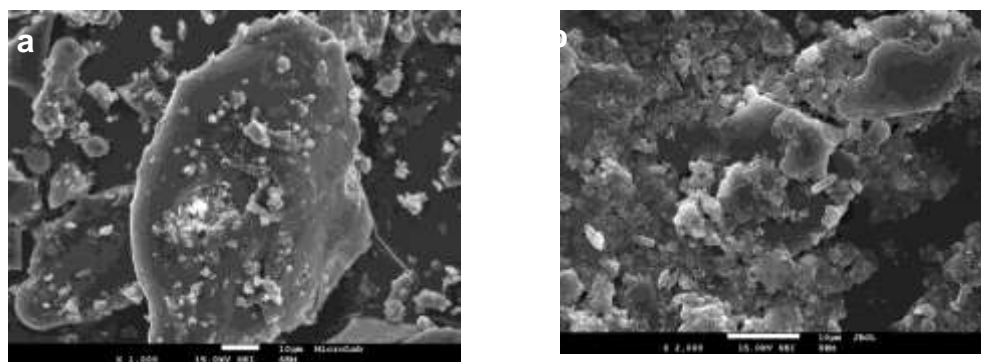


Figura 58 - Fotografias da técnica SEM das 1% AgNPs produzidas a partir dos dois tipos de chá. a) Chá 1; b) Chá 2 .

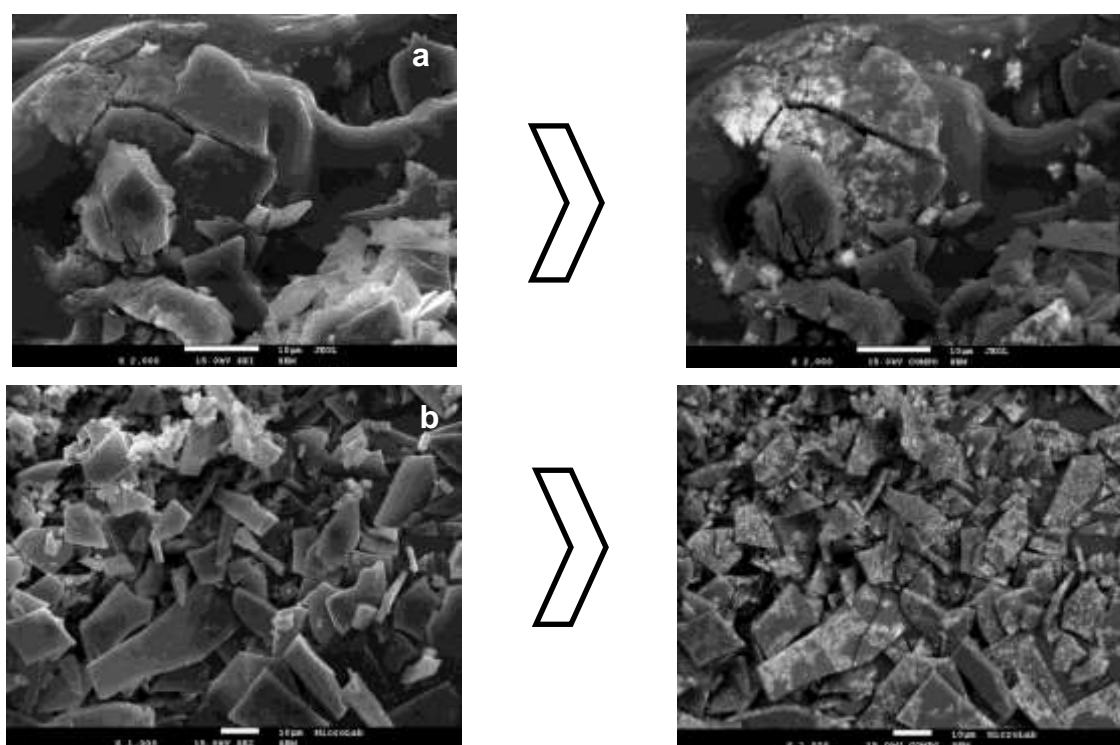


Figura 59 – Imagens da análise SEM. Exemplos da utilização do detetor de elétrons retrodifundidos para a identificação de metais na amostra das 1% AgNPs sintetizadas pelo método simples. a) 1% AgNPs/chá 3; b) 1% AgNPs/chá 4.

A análise das AgNPs, sintetizadas com diferentes extratos de chá, por EDS confirma a presença dos sinais característicos da prata, para todos os estudos efetuados. A Figura 64 apresenta as fotografias de SEM com a respetiva análise EDS num ponto específico da imagem. Nestas análises foram identificados picos expectáveis de prata, bem como picos correspondentes a carbono (C) são originários da grelha usada e todos os picos de potássio, magnésio, fósforo e oxigénio (K, Mg, P e O) correspondentes ao meio envolvente das AgNPs, para todas as soluções de chá testados.

Pelas imagens da técnica SEM as AgNPs sintetizadas por diferentes extratos de chá indicam que todos os métodos explorados apresentam uma grande quantidade de AgNPs e uma boa uniformidade, por toda a área da amostra, exceto para as AgNPs sintetizadas pelos chás 5 e 6, para

os quais foi mais difícil observar a presença de prata. Conclui-se que apesar de estes dois extratos possuírem AgNPs (como verificado pela análise TEM), a sua dispersão não é muito elevada, uma vez que foram verificados vários espaços sem vestígios de prata.

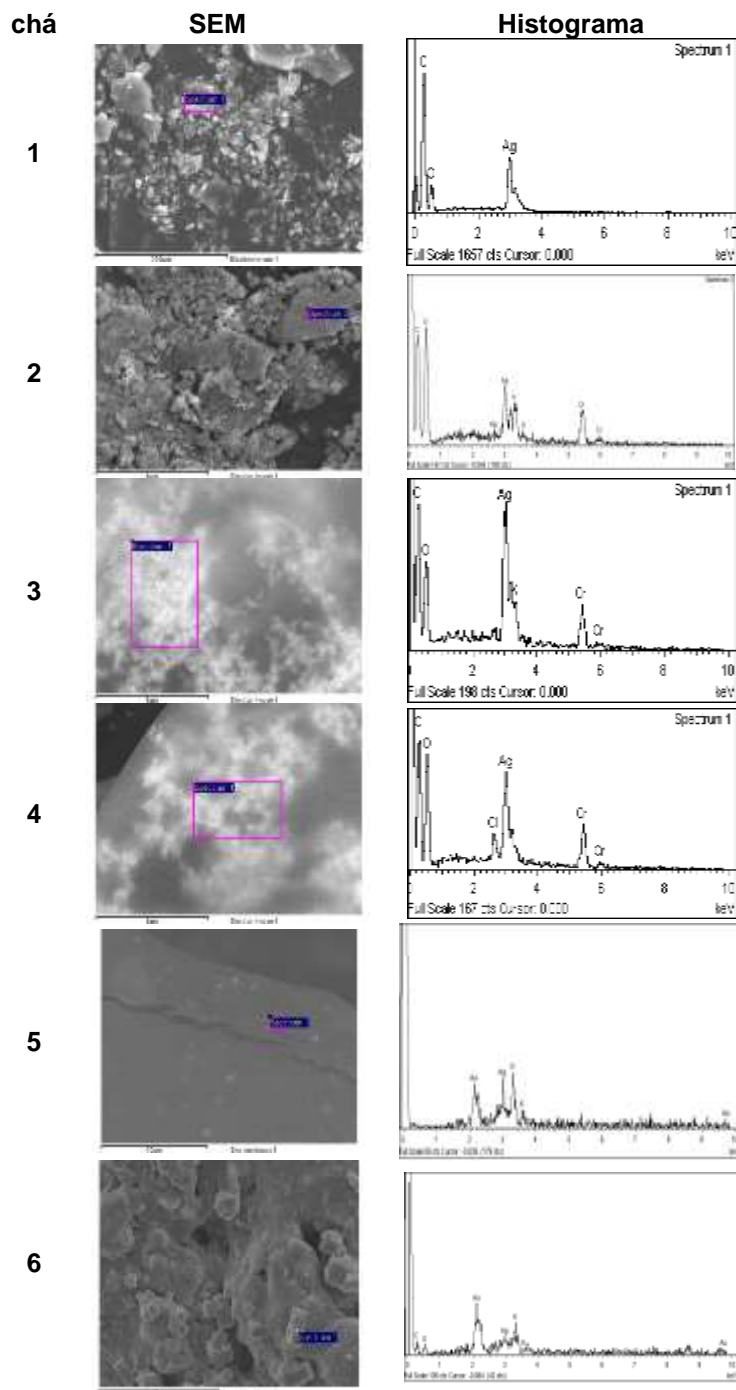


Figura 60 - Análise EDS das AgNPs produzidas por diferentes extratos de chá, pelo método de síntese simples. a) **Chá 1**; b) **Chá 2**; c) **Chá 3**; d) **Chá 4**; e) **Chá 5**; f) **Chá 6**.

II.3.3– QUANTIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Tal como para as AuNPs também foi efetuada a quantificação do número de AgNPs produzidas, nomeadamente pelos diferentes extratos de chá utilizados, com base nos resultados obtidos pela técnica TEM. Foi possível concluir acerca da forma das NPs formadas, maioritariamente de forma esférica, e também determinar o valor do raio médio das NPs sintetizadas. Assim, considerando a forma esférica das partículas e utilizando as equações 1, 2 e 3, foi possível determinar o número de átomos de prata, sendo que o valor de r_{NP} é obtido pela análise TEM para as diferentes NPs formadas com os diferentes extratos de chá e $r_{atom} = 160 \text{ pm}$ (raio atômico da prata).

$$N = \left(\frac{r_{NP}}{r_{atom}} \right)^3 \quad (3)$$

O número de átomos à superfície, N_s , numa única nanopartícula de prata, é estimado utilizando a equação 4, enquanto o número de átomos de prata, N_{atom} é determinado pela equação 5. Assim, é possível calcular a quantidade de AgNPs formadas através de cada método e o número total de átomos (N_{ts}) de Ag na superfície (disponíveis para a reação catalítica), pelas equações 6 e 7.

Os cálculos do N_{atm} foram efetuados para as AgNPs obtidas através dos diferentes extratos de chá e através dos diferentes métodos de síntese para uma concentração de $4,34 \times 10^{-5} \text{ M}$ de AgNPs (concentração mais utilizada nos estudos catalíticos). Assim, pelos resultados obtidos é possível verificar que os diferentes métodos produzem diferentes quantidades de AgNPs, variando consoante o extrato de chá. Pelos cálculos efetuados, é possível verificar que para o método MS, as AgNPs sintetizadas pelo **chá 5** são as que apresentam maior número de NPs, enquanto com o **chá 2** revelou menor número de NPs. Pelos métodos analisados verificou-se que o MW a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ é o que apresenta maior número de NPs formadas, para os dois extratos de chá estudados, enquanto as AgNPs sintetizadas com o **chá 4**, produzido pelo método US é o que apresenta menor número de NPs, indicando que estas apresentam tamanhos maiores.

Tabela 10 - Cálculo do número de nanopartículas formadas e do número de átomos de Ag à superfície de cada nanopartícula, para AgNPs produzidas por diferentes extratos de chá e pelos diferentes métodos sintéticos.^a

Método	Chá	r_{aglom} (nm)	N	N_{atm}	N_{NP}	N_{ts}
MS	1	18,5	$1,6 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{14}$	$5,3 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{16}$
	2	19,0	$1,7 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{14}$	$4,9 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{16}$
	3	16,5	$1,1 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{14}$	$7,5 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{16}$
	4	13,0	$5,4 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{14}$	$1,5 \times 10^{12}$	$4,1 \times 10^{16}$
	5	7,0	$8,4 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{14}$	$9,8 \times 10^{12}$	$7,5 \times 10^{16}$
	6	9,0	$1,8 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{14}$	$4,6 \times 10^{12}$	$5,9 \times 10^{16}$
US	1	6,0	$5,3 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{14}$	$1,6 \times 10^{13}$	$8,8 \times 10^{16}$
	3	19,0	$1,7 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{14}$	$4,9 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{16}$
	4	23,5	$3,2 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{14}$	$2,6 \times 10^{11}$	$2,2 \times 10^{16}$
	5	-	-	-	-	-
	6	11,0	$3,3 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{14}$	$2,5 \times 10^{12}$	$4,8 \times 10^{16}$
MW	1	16,0	$1,0 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{14}$	$8,2 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^{16}$
	3	18,0	$1,4 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{14}$	$5,8 \times 10^{11}$	$2,9 \times 10^{16}$
	4	8,5	$1,5 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{14}$	$5,5 \times 10^{12}$	$6,2 \times 10^{16}$
	5	-	-	-	-	-
	6	6,5	$6,7 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{14}$	$1,2 \times 10^{13}$	$8,1 \times 10^{16}$
	1 ^b	5,0	$3,1 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{14}$	$2,7 \times 10^{13}$	$1,1 \times 10^{17}$

^aCondições reaccionais: $[4\text{-NF}] = 3,8 \times 10^{-5}$ M; $[1\% \text{ AuNPs}] = 4,3 \times 10^{-5}$ M. ^bTOF = TON por hora.

^b Reação realizada a 150°C.

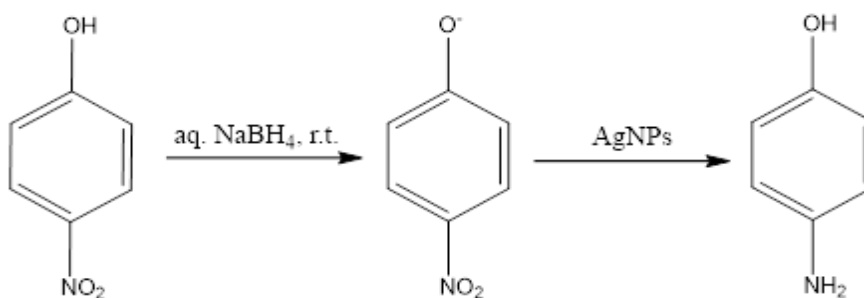
É sabido que as partículas mais pequenas são mais ativas uma vez que têm um número maior de átomos de superfície, disponíveis para a catálise. Assim, têm interesse extratos de chás que promovam a síntese de nanopartículas com tamanhos pequenos, no entanto, é possível que tamanhos muito pequenos não sejam muito benéficos para a atividade catalítica das nanopartículas, por apresentarem maiores dificuldades de difusão.

II.3.4– ESTUDOS CATALÍTICOS

A atividade catalítica das AgNPs sintetizadas, pelo método simples, MW ou US, foi investigada para a redução do 2- e 4-nitrofenol, 3- e 4-nitroanilina e nitrobenzeno, em meio aquoso. As AgNPs sintetizadas pelo método simples, também foram testadas ainda como catalisadores na redução do hexacianoferrato (III), em meio aquoso.

II.3.4.1– Redução do 2- e 4-nitrofenol em meio aquoso

À semelhança das AuNPs, as AgNPs foram utilizadas para catalisar a redução do 2- e 4-NF (Esquema 3 para o 4-NF), usando borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor em solução aquosa, à temperatura ambiente. Verificou-se que os produtos, 2- e 4-aminofenol (2- e 4-AF) são os únicos produtos de redução obtidos e a sua conversão foi seguida pela técnica de espectroscopia de UV-Vis.



Esquema 3 – Redução do 4-nitrofenol (4-NF) a 4-aminofenol (4-AF) por NaBH_4 catalisado por AgNPs.

As condições experimentais utilizadas para a reação, bem como a metodologia da reação, foram as homólogas às melhores condições usadas com as AuNPs, ou seja, $[\text{AgNPs}] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4\text{-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ à temperatura ambiente e durante 20 ou 40 minutos, sendo a reação monitorizada por espectroscopia de UV-Vis. Os varrimentos realizados de 2 em 2 minutos foram sobrepostos para se obter uma representação sequencial da reação.

A evolução temporal da redução do 4-NF pelo NaBH_4 na ausência e na presença de AgNPs foi monitorizada por espectroscopia de UV-Vis, entre 200 e 700 nm. Na ausência de catalisador (AgNPs), ocorre a formação dos íons 2- e 4-nitrofenolato mas não a sua conversão em 2- e 4-AF. Assim as AgNPs facilitam a redução do 2- e 4-NF, nomeadamente facilitam a transferência dos elétrons do borohidreto para os íons 2- ou 4-nitrofenolato, baixando a energia de ativação desta reação. Na presença de AgNPs, verifica-se de imediato uma redução na absorvância a 410 e 400 nm, correspondente aos íons 2- ou 4-nitrofenolato, respetivamente, por espectroscopia UV-Vis. Simultaneamente observa-se o aparecimento de dois novos picos máximos a ca. de 250 ou 290 nm correspondentes aos produtos 2- ou 4-AF esperados (valores observados para as soluções de 2- e 4-AF puras).

As Figuras 65 e 66 representam as reduções do 2- e do 4-NF, respetivamente, no entanto, a cada varrimento apresentado foram descontados os valores obtidos no varrimento efetuado apenas à mistura do extrato de **chá 1** com as 1% AgNPs sintetizadas. Deste modo, não se visualiza as bandas do chá, o que torna possível a visualização clara de pontos isobésticos no espectro, que denunciam o incremento de bandas características do produto esperado (2- e 4-aminofenol). No espectro também não é visível as bandas características dos substratos (2- e 4-NF), observando-se apenas a banda característica do ião 2- e 4-nitrofenolato, uma vez que as figuras só apresentam os scans decorrentes imediatamente após a adição do agente redutor (NaBH_4). A redução do 2-nitrofenol a 2-aminofenol ocorre gradualmente, sendo obtida uma conversão de cerca de 45 % em 32 minutos.

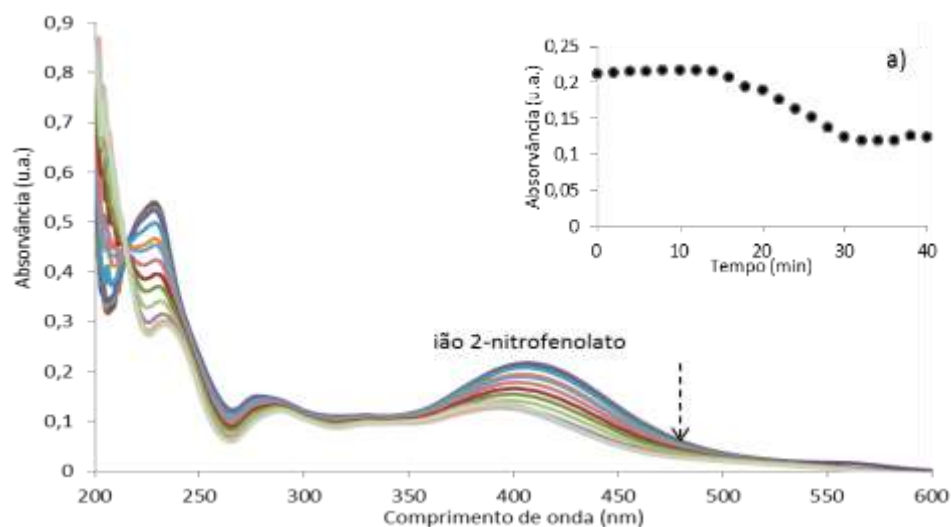


Figura 61 – Espectros de UV-Vis da redução do 2-nitrofenol (2-NF) na presença de 1% AgNPs/**chá 1**. Condições reacionais: $[\text{AgNPs}] = 4,34 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[2\text{-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo.

No sistema catalisado por AgNPs, a transformação dos iões 4-nitrofenolato no produto 4-AF, ocorre mais lentamente em comparação com as AuNPs sintetizadas pelo mesmo método, tendo-se obtido para este caso uma conversão de 71 % ao fim de 20 minutos de reação, enquanto no caso das AuNPs se obteve uma conversão de 94 % ao fim de 6 minutos de reação, nas mesmas condições reacionais.

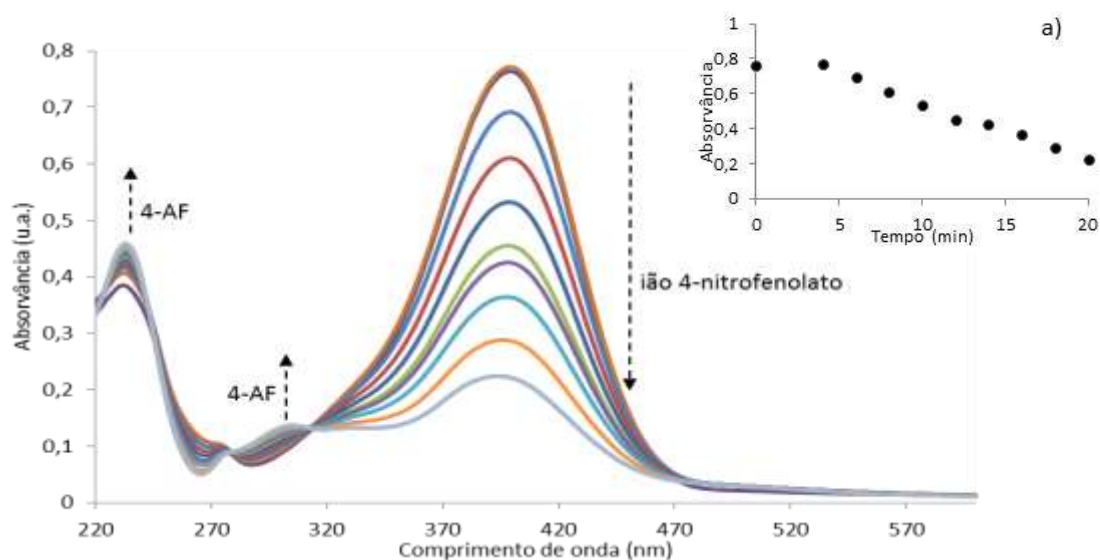


Figura 62 – Espectro de UV-Vis da reação de redução do 4-NF catalisado por 1% AgNPs/chá 1. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 400 nm vs. tempo de reação.

Na redução do 4-NF, não se verifica qualquer alteração no valor de absorvância 400 nm nos 2 minutos iniciais, *i.e.*, não ocorre a transformação do ião 4-nitrofenolato (período de indução). Após este período observa-se uma redução acentuada (Figura 66a), voltando a estabilizar após 20 minutos de reação. Esta variação na velocidade da reação provavelmente é devida à existência de vários passos distintos e individuais de hidrogenação, neste processo.

Para esta reação foi estudado o efeito de diferentes parâmetros, nomeadamente foi estudada a performance de AgNPs sintetizadas por diferentes extratos de chá e através de diferentes métodos sintéticos envolvendo a aplicação de radiação microondas (MW) e ultrassons (US).

As AgNPs sintetizadas utilizando diferentes extratos de **chá (2-6)** foram avaliadas como catalisadores na reação de redução do 4-NF. O efeito das diferentes propriedades físicas (tamanho e forma) na sua performance foi explorado. A Figura 67 apresenta o estudo da reação de redução do 4-NF com as AgNPs sintetizadas com os diferentes extratos de **chá (2-6)**, ao longo de 20 minutos. Assim, é possível verificar que na presença das AgNPs (**chá 2**) quase não ocorre a redução do 4-NF, não indo a conversão além dos 2% ao fim deste período. No entanto é de salientar que esta reação apresenta um período de indução de 18 minutos, pelo que a conversão que se obtém ocorre praticamente nos 2 minutos finais. Para os **chás 3, 4 e 6**, já é verificado um decréscimo apreciável, sendo o maior registado para o **chá 6**, com o qual se obteve uma conversão de 69%. A reação com AgNPs sintetizadas com o **chá 5** é a mais díspar das outras, verificando-se que o intermediário leva mais tempo a ser formado e que posteriormente não se reduz significativamente. Pelos dados obtidos com a análise de TEM, foi possível verificar que estas AgNPs possuem um tamanho médio muito reduzido, o que poderá ser o motivo da difícil indução da reação. Verifica-se ainda que o **chá 1** é o que apresenta melhores resultados, indicando que o tamanho médio e distribuição destas

nanopartículas, são as mais favoráveis para este sistema catalítico. Assim, é possível perceber, que embora nanopartículas menores apresentem maiores áreas superficiais, tamanhos muito reduzidos, também não são favoráveis, apresentando maiores tempos de indução.

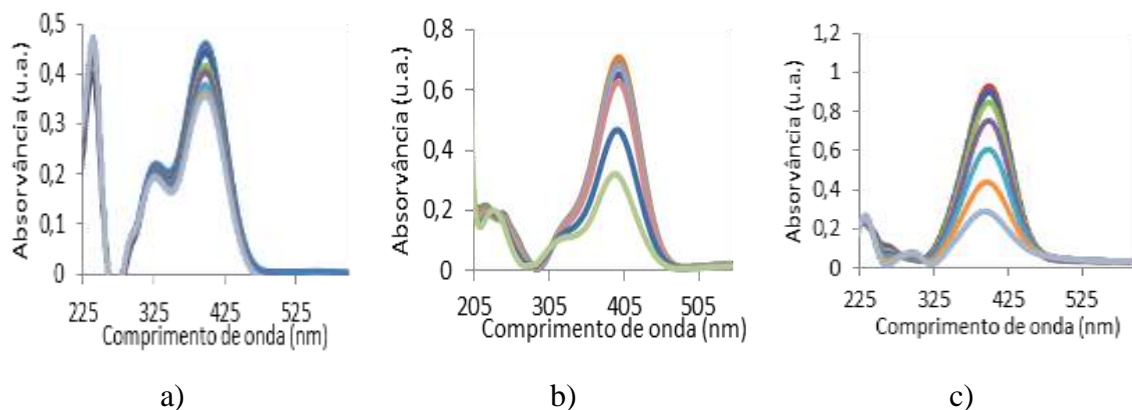


Figura 63 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método simples por diferentes extratos de chá: a) **Chá 3**; b) **Chá 4** e c) **Chá 6**. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Tabela 11 - Valores de k_{app} e de conversão para a redução do 4-NF com AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá, pelo método simples.^a

Chá	k_{app}	Conversão (%)
1	0,0737	71,26
2	0,0084	2,44
3	0,0198	22,75
4	0,1311	55,95
5	0,1124	34,55
6	0,1613	69,22

^a Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ e 20 min de reação.

II.3.4.1.1– Efeito de AgNPs sintetizadas por diferentes métodos

Tendo em conta que para as AuNPs foram estudados efeitos como a concentração de catalisador e de redutor, para as AgNPs optou-se por estudar métodos sintéticos alternativos. Assim, tentou-se encontrar métodos de síntese de AgNPs, que contornassem o problema do tempo de síntese (as AuNPs são sintetizadas muito mais rapidamente), nomeadamente envolvendo irradiação microondas ou ultrassons. Foi estudado o efeito destas metodologias no crescimento e qualidade das AgNPs sintetizadas. Também foram efetuados estudos catalíticos de forma a concluir sob a sua atividade catalítica, cruzando dados com os resultados obtidos pela sua caracterização.

Método de síntese por Microondas

A técnica microondas (MW) foi aplicada a valores de temperatura de 35 e 150 °C. A síntese de AgNPs com irradiação microondas, a temperaturas de 35°C foi efetuada para todos os extratos de chá utilizados no presente trabalho (extrato a 1%), enquanto a síntese a temperaturas elevadas foi efetuada apenas para os **chás 1 e 2**.

A Figura 68 representa a redução do 4-NF com NaBH₄, ao longo de 20 minutos, na presença de AgNPs sintetizadas por MW a 35°C, com diferentes extratos de chá (Figura 68 para AgNPs sintetizadas com os **chás 1, 4 e 5**, Anexo F, Figura VI para os restantes) e a Tabela 12 apresenta os valores de conversão e da constante de equilíbrio aparente (k_{app}), obtidos para cada reação. Assim, é possível verificar que o extrato de chá que apresenta melhores resultados, é novamente o **chá 1**, com uma conversão de 78% em 20 minutos. Este valor é superior ao obtido, para a mesma reação, com AgNPs produzidas pelo método simples (aproximadamente 71% de conversão em 20 min). Pela técnica de TEM é possível verificar que as AgNPs produzidas pelo método MW apresentam tamanhos médios inferiores, e uma menor dispersão de tamanhos, que as sintetizadas pelo método simples, o que explica a sua maior reatividade na presente reação. Por este estudo foi possível verificar que a aplicação do método MW na síntese das AgNPs com o **chá 6** parece ter tido um grande impacto na sua atividade catalítica, uma vez que com o método simples se obteve uma conversão de aproximadamente 69%, enquanto apenas houve 10% de conversão quando utilizadas as AgNPs formadas sob irradiação MW. Pelos dados obtidos pela análise TEM (Anexo E), embora se verifique tamanhos médios inferiores e uma menor dispersão para as AgNPs preparadas com este chá, por MW, também é visível à volta das NPs uma camada de compostos orgânicos, que pode ser responsável pela fraca atividade destas NPs, impedindo o contacto dos reagentes, com o catalisador. Para o **chá 4**, também se verifica um decréscimo de atividade, podendo ser explicado pelo aumento da dispersão dos tamanhos das AgNPs. Para os **chás 3 e 6**, foi verificado um aumento da conversão para as AgNPs sintetizadas pelo método MW, em comparação com as sintetizadas com o mesmo extrato, mas pelo método simples, neste caso devido a uma menor dispersão de tamanhos.

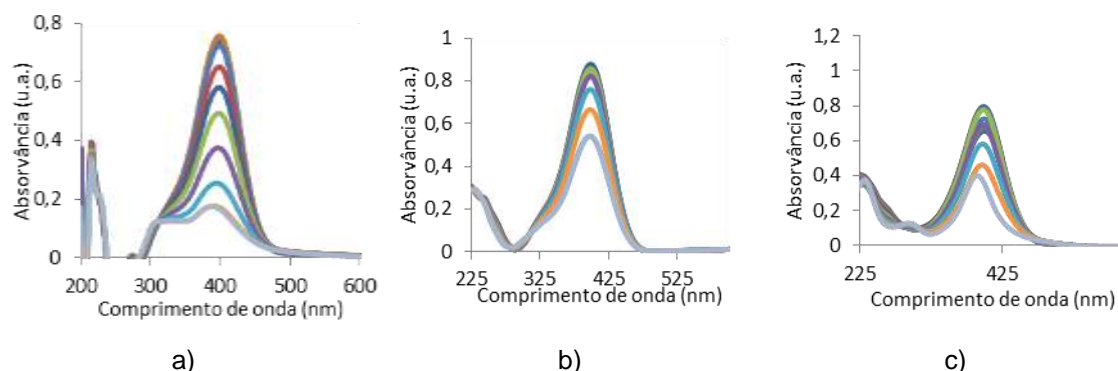


Figura 64 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método MW, por diferentes extratos de chá: a) **Chá 1**; b) **Chá 4**; c) **Chá 5**. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Tabela 12 - Valores de k_{app} e de conversão para a redução do 4-NF com AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá pelo método MW.^a

Chá	k_{app}	Conversão (%)
1	0,1184	78,00
1^b	0,01	2,23
2	-	0
2^b	0,0023	0,44
3	0,0333	33,40
4	0,0692	38,47
5	0,0991	55,35
6	0,0230	9,67

^aCondições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$; tempo de reação = 20 min; T = 35°C. ^b Reação realizada a 150°C.

A Figura 68 e a Tabela 11 apresentam os dados do estudo efetuado para as AgNPs sintetizadas por MW a elevadas temperaturas, com os extratos de **chá 1** e **2**. Neste caso é possível concluir, que embora a síntese das nanopartículas seja muito mais rápida do que com os outros métodos estudados, verifica-se que as alterações na morfologia destas alteram drasticamente a sua atividade catalítica para o caso das AgNPs sintetizadas com o extrato de **chá 1**, e continuando a não favorecer a atividade catalítica das AgNPs sintetizadas com **chá 2** ("Christmas tea").

Método de síntese por Ultrassons

A síntese recorrendo a irradiação por ultrassom (US) foi realizada nas mesmas condições reacionais do método simples com a variante de a mistura reacional estar mergulhada num banho de US. Esta alteração tem influência na morfologia das NPs formadas, e consequentemente na sua atividade catalítica.

Na Figura 69 está representada a evolução da redução do 4-nitrofenol (4-NF) durante 20 minutos pelo método US, com diferentes extratos de chá (Figura 69 para os **chás 1, 2 e 5**, Anexo F, Figura VII para os restantes) e na Tabela 12 apresentam-se os valores de conversão e k_{app} , para as reações efetuadas com todos os extratos de chá. Nestas condições, verifica-se que as AgNPs produzidas utilizando o **chá 1**, as AgNPs são as mais ativas, convertendo 64% de 4-NF ao fim de 20 min, seguida pelas AgNPs obtidas a partir dos **chás 2, 4 e 6** com conversões no intervalo 43-47%. Tal pode ser devido ao facto de estas NPs apresentarem uma menor distribuição de tamanhos, como verificado pela banda SPR da análise de UV-Vis. As AgNPs obtidas a partir dos **chás 3 e 5** são praticamente inativas, apresentando um elevado decréscimo de atividade catalítica, comparativamente as AgNPs produzidas por outros métodos. Esta diminuição na atividade catalítica das AgNPs produzidas recorrendo a irradiação US poderá dever-se ao facto de este método gerar NPs com uma má distribuição, uma vez que pela técnica SEM existem várias zonas onde não é observável a presença das mesmas.

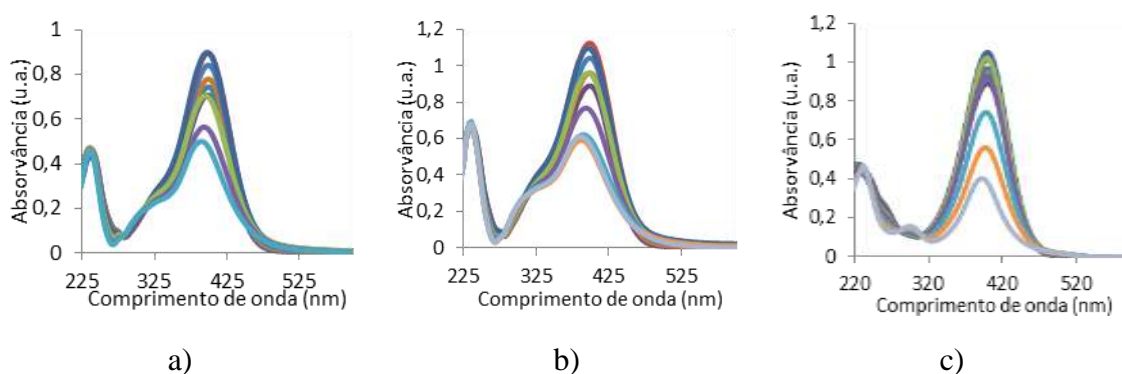


Figura 65 - Espectro UV-Vis da reação de redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método US por diferentes extratos de chá: a) **Chá 1**; b) **Chá 2**; c) **Chá 5**. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5}$ M; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5}$ M; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3}$ M.

Tabela 13 - Valores de k_{app} e de conversão para a redução do 4-NF com AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá pelo método US^a

Chá	k_{app}	Conversão (%)
1	0,1061	46,80
2	0,0913	45,04
3	0,0002	0,04
4	0,0688	43,06
5	0,1660	63,78
6	0,0030	1,19

^aCondições reacionais: $[AgNPs] = 4,34 \times 10^{-5}$ M; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5}$ M; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3}$ M; temperatura ambiente; tempo de reação = 20 min.

Pelos estudos efetuados às NPs produzidas por métodos sintéticos alternativos é possível verificar que estes têm efeitos diferentes consoante o tipo de chá utilizado. O aumento ou diminuição da atividade catalítica está diretamente relacionado com a morfologia das AgNPs que por sua vez varia com o método de síntese. É sabido que o tamanho das NPs de metal tem um papel muito importante nos sistemas catalíticos, sendo que a área superficial das NPs aumenta com a diminuição do seu tamanho, o que normalmente resulta numa maior atividade.^{89,92,93,94} Porém, às vezes existe um tamanho de partícula ótimo para um sistema catalítico particular.^{95,96}

II.3.4.2– Redução da 4-nitroanilina em meio aquoso

À semelhança do estudo efetuado para as AuNPs, a atividade catalítica das AgNPs (sintetizadas pelo método MS) também foi avaliada para a redução da 4-nitroanilina (4-NA), usando NaBH_4 como agente redutor. A reação de redução foi estudada nas condições homólogas às utilizadas com as AuNPs ($[\text{AgNPs}] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4\text{-NA}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$). A banda de absorvância a 380 nm, característica da 4-NA, diminui gradualmente por redução, na presença de AgNPs e NaBH_4 (Figura 70). Ao mesmo tempo, surge uma nova banda a 238 nm devido à formação do produto, 4-fenilenodiamina (4-FD). Uma segunda banda característica da 4-FD aparece normalmente a 308 nm, sendo de mais difícil perceção devido ao tamanho da banda da 4-NA. Ao longo do tempo de reação estudado não foram detetados outros produtos. O substrato 3-NA também foi testado nas mesmas condições, mas não se verificou qualquer conversão para essa reação, ao fim de 20 minutos (Anexo G).

A Figura 70 representa a redução da 4-NA na presença de 1% AgNPs (obtidas com o **chá 1**), onde é possível observar que a conversão é bastante reduzida (7% ao fim de 20 min) e que esta leva muito tempo até apresentar um decréscimo da banda do substrato (Figura 70a). Assim é possível concluir que a morfologia das AgNPs sintetizadas não favorece esta reação.

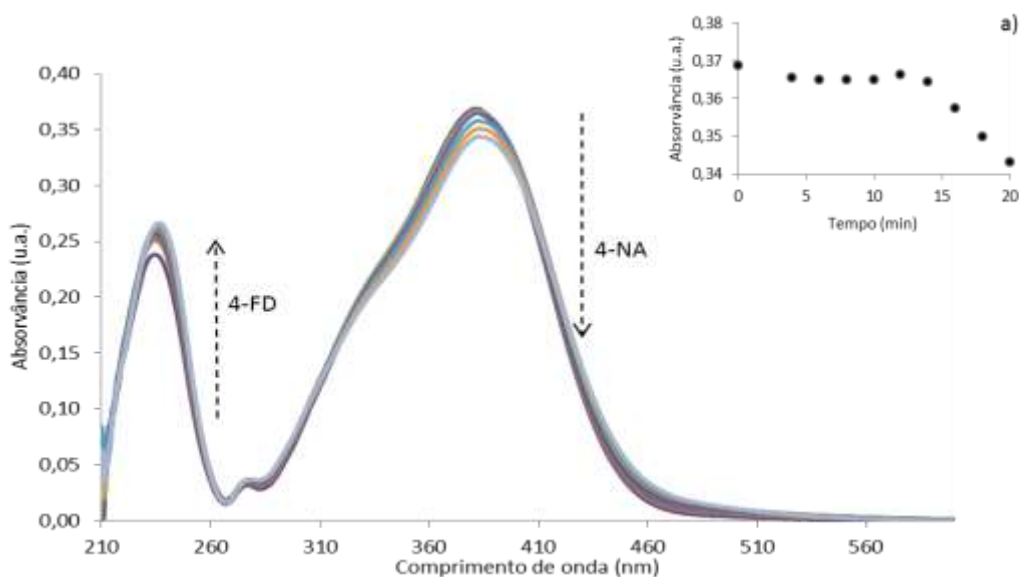


Figura 66 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-NA catalisada por 1% AgNPs/chá 1. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} M$; $[4-NA] = 3,8 \times 10^{-5} M$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} M$. a) Absorvância a 380 nm vs. tempo de reação.

Para esta reação também foi estudada a atividade catalítica das AgNPs sintetizadas com outros extratos de chá, nomeadamente **chá 3** e **4**, pelo método simples.

II.3.4.2.1– Efeito de AgNPs sintetizadas por diferentes extratos de chá

A influência do extrato de chá usado na síntese das AgNPs também foi estudada na reação de redução da 4-NA. A Figura 71 apresenta o estudo desta reação catalisada por AgNPs sintetizadas com diferentes extratos de chá, pelo método simples, ao fim de 20 minutos de reação. Foi possível observar melhor desempenho por parte das AgNPs sintetizadas com o **chá 4**, sendo possível obter uma conversão de 33 %. Em contraste, na presença de AgNPs obtidas a partir do extrato de **chá 3**, a conversão não foi além dos 3 %, ao fim do mesmo período. De notar que a redução apenas se inicia após 10 min de reação já terem decorrido (período de indução).

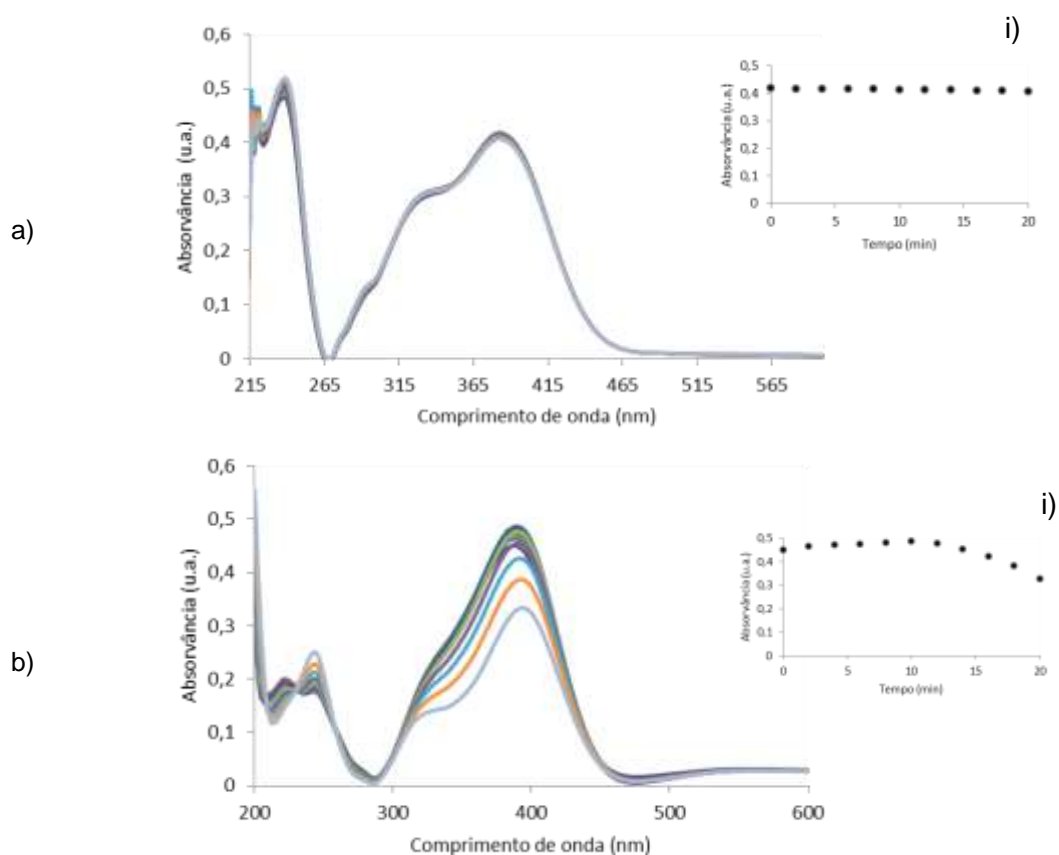


Figura 67 - Espectro UV-Vis da reação de redução da 4-nitroanilina (4-NA) catalisada por 1% AgNPs sintetizadas pelo método simples e por diferentes extratos de chá: a) **chá 3**; b) **chá 4**. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. i) Absorvância a 380 nm vs. tempo de reação.

II.3.4.3– Redução do nitrobenzeno em meio aquoso

A Figura 72 apresenta a reação de redução do nitrobenzeno (NB), catalisada por 1% AgNPs/**chá 1**. É possível visualizar 3 pontos isobésticos, sendo visível a redução na intensidade das bandas características do nitrobenzeno a 270 nm e 400 nm e o consequente aumento da banda a ca. de 230 nm correspondente à anilina (AN). Na presença de AgNPs, foi possível obter uma conversão de 66% do NB ao fim de 40 minutos de reação, sendo possível concluir que estas NPs são ligeiramente menos ativas que as AuNPs preparadas pelo mesmo método (70% de conversão para o mesmo período de tempo).

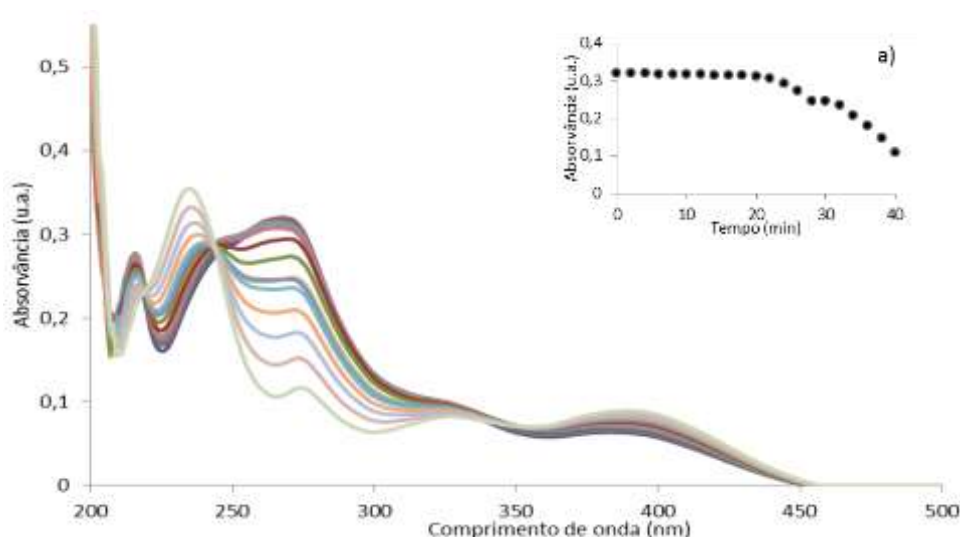


Figura 68 - Espectros de UV-Vis da reação de redução do nitrobenzeno catalisada por 1% AgNPs. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4\text{-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$; tempo de reação = 40 min. a) Absorvância a 270 nm vs tempo de reação.

II.3.4.4– Cálculo do TOF

O valor do TOF também foi calculado para as AgNPs sintetizadas, à semelhança do efectuado para as AuNPs. Este parâmetro foi calculado para a redução do 4-NF nas condições reacionais padrão ($[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4\text{-NF}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$), à temperatura ambiente para valores de tempo e conversão conhecidos, pela equação 16.

$$TOF = \frac{M}{N_s \cdot t} \quad (16)$$

onde M é o número de moléculas que reagem na presença de catalisador no tempo t para produzir o produto, e N_s é o número de átomos à superfície do catalisador que estão envolvidos na reação.

Na prática, os valores de TOF podem variar significativamente entre catalisadores do mesmo tipo devido a diferenças na sua estrutura de superfície. Neste sistema catalítico, os diferentes valores de TOF obtidos, serão devidos aos diferentes métodos de preparação das AgNPs e consequentemente ao seu tamanho e morfologia.

O TOF deve ser definido em condições específicas de temperatura, concentração dos reagentes e conversão.

Tabela 14 - Redução do 4-NF catalisada por AgNPs^a

Método	Chá	Nts	Conversão (%)	Tempo (min)	TOF (h ⁻¹)
MS	1	2,8 x10 ¹⁶	71,3	20	54,1
	2	2,7 x10 ¹⁶	2,4	20	1,9
	3	3,2 x10 ¹⁶	22,8	20	15,4
	4	4,1 x10 ¹⁶	56,0	12	49,8
	5	7,5 x10 ¹⁶	34,6	10	19,9
	6	5,9 x10 ¹⁶	69,2	20	25,6
US	1	8,8 x10 ¹⁶	46,8	16	14,4
	2	-	45,0	18	-
	3	2,8 x10 ¹⁶	0,0	20	0
	4	2,2 x10 ¹⁶	43,1	20	41,5
	5	-	63,8	20	-
	6	4,8 x10 ¹⁶	1,2	20	0,5
MW 35°C	1	3,3 x10 ¹⁶	78,0	18	56,9
	2	-	0,0	20	-
	3	2,9 x10 ¹⁶	33,4	20	24,7
	4	6,2 x10 ¹⁶	38,5	10	26,8
	5	-	55,4	20	-
	6	8,1 x10 ¹⁶	9,7	20	2,6
MW 150°C	1	1,1 x10 ¹⁷	2,2	18	0,5

^a[AgNPs] = 4,34x10⁻⁵ M; [4-NF] = 3,8x10⁻⁵ M; [NaBH₄] = 1,6x10⁻³ M.

II.3.4.5– Degradação de pigmentos

Com este estudo pretendia-se apresentar uma alternativa para a degradação de compostos poluentes não biodegradáveis normalmente presentes em águas residuais. O objetivo seria procurar uma alternativa eficiente e não poluente, para o tratamento dessas águas, tentando fugir às técnicas físicas usuais, como adsorção e coagulação, que não permitem a eliminação completa destes compostos, ou métodos químicos ou de membranas que são caros e por vezes produzem compostos secundários poluentes.⁵⁶

Os pigmentos testados neste estudo foram o alaranjado de metilo e o azul metileno. A degradação destes compostos pode ser realizada recorrendo a agentes oxidantes, altamente reativos e não seletivos como H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{O}^{2-}$, O_3 .⁵⁶ A completa descoloração e mineralização de corantes usando radiação UV, na presença de H_2O_2 e materiais porosos metal-orgânicos, foi previamente reportada.^{56,57,140}

Pretendeu-se estudar a capacidade de degradação de dois corantes diferentes (alaranjado de metilo e o azul metileno) do extrato de chá e do extrato de chá com AgNPs sintetizadas (1% AgNPs/chá 1), na presença e na ausência do oxidante H_2O_2 . Este estudo foi efetuado expondo as soluções a radiação UV-Vis e à luz visível.

Para o corante alaranjado de metilo as amostras foram estudadas para um tempo de exposição de 5 minutos à radiação UV-Vis, na presença e na ausência de AgNPs e de agente oxidante (H_2O_2). Não foi observada qualquer degradação de corante, nas condições testadas, quer visualmente ou através da análise de espectro UV-Vis (Figura 73). Também foram realizados ensaios com exposição à luz solar, por um longo período de tempo (ca. de 5 horas de exposição), tendo-se verificado apenas alguma degradação, para as soluções contendo o agente oxidante (H_2O_2). No entanto verificou-se que no ensaio realizado na ausência de extrato de chá ou AgNPs, apenas com o agente oxidante, foi possível observar uma considerável degradação do corante. Estes resultados indicam que o agente oxidante é favorável à degradação do corante, mas que as AgNPs não catalisam, este sistema, chegando mesmo a inibir a atividade do oxidante quando são adicionadas. Esta inibição é provavelmente devida ao facto de o agente oxidante poder estar a interagir com as AgNPs, promovendo a sua oxidação, em vez de apenas degradar o corante.

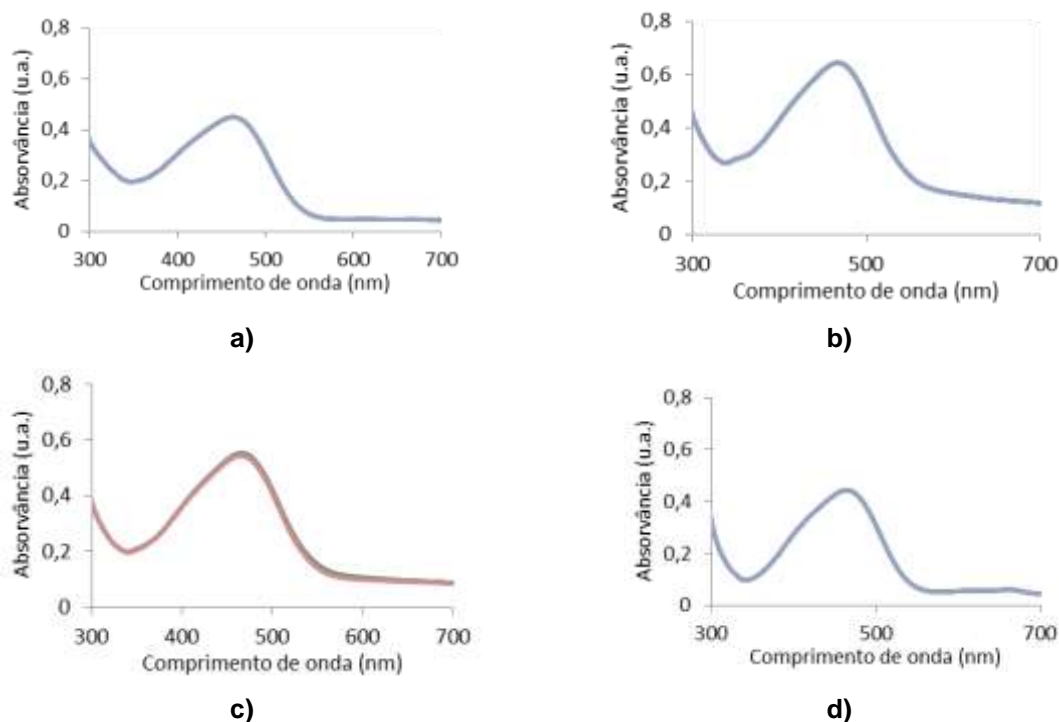


Figura 69 - Espectro UV-Vis do ensaio da degradação do corante alaranjado de metilo, durante 20 min, por radiação UV com a) extrato de **chá 1** a 1%; b) 1% AgNPs/**chá 1** ([catalisador]= $5,29 \times 10^{-5}$ M); c) 1% AgNPs/**chá 1** e H_2O_2 ([catalisador]= $2,65 \times 10^{-5}$ M [H_2O_2]=0,14 M) e d) apenas H_2O_2 ([H_2O_2]=0,28 M). ([pigmento] = $1,18 \times 10^{-5}$ M)

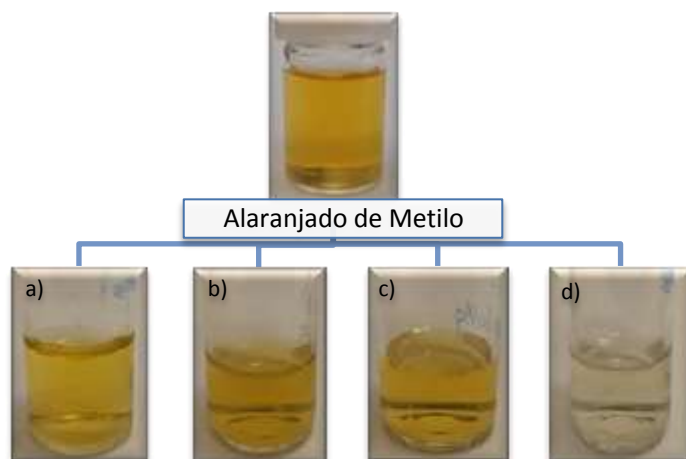


Figura 70 - Ensaio da degradação do corante alaranjado de metilo, durante 5 horas, por radiação de luz solar na presença de a) extrato de **chá 1** a 1%; b) 1% AgNPs/**chá 1** ([catalisador]= $5,29 \times 10^{-5}$ M); c) 1% AgNPs/**chá 1** e H_2O_2 ([catalisador]= $2,65 \times 10^{-5}$ M [H_2O_2]=0,14 M) e d) apenas H_2O_2 ([H_2O_2]=0,28 M). ([pigmento] = $1,18 \times 10^{-5}$ M).

Para o corante azul metileno foi possível observar alguma percentagem de degradação para as soluções expostas 20 minutos à radiação ultravioleta (Figura 75), no entanto o valor máximo de degradação observado foi ca. de 4 %, com o extrato de chá contendo AgNPs. Também foram

efetuadas variações do ensaio que inclui o extrato de chá com AgNPs e o agente oxidante, nomeadamente nas quantidades adicionadas de cada um dos compostos. Para além da solução onde se adiciona 80 μL da solução de chá com AgNPs e 20 μL de H_2O_2 (Figura 75 c)), num dos ensaios foram adicionadas quantidades iguais de ambos e outro continha uma maior quantidade de H_2O_2 em relação ao chá (80 μL de H_2O_2 e 20 μL de extrato de chá cm AgNPs) (Figura 75a e b), Anexo H)). Para o teste com quantidades iguais de cada composto adicionado foi possível obter uma degradação ligeiramente maior do que para os outros dois casos, de 3,8 % (o ensaio com maior quantidade de H_2O_2 obteve 3,6 % de conversão).

Os testes à luz visível, realizados com maior tempo de exposição (ca. 5 horas), já apresentam degradações do corante, mais acentuadas (Figura 76). É possível verificar uma diminuição da intensidade da cor do corante para todas as soluções, sendo que o ensaio em que se utiliza apenas o agente oxidante obtém-se uma solução praticamente translúcida, indicando que este agente consegue efetuar a descoloração quase total do corante, no tempo do ensaio. Estes resultados no entanto não são muito positivos, uma vez que os melhores resultados são verificados para a utilização de H_2O_2 , que é um agente oxidante forte e o objetivo era encontrar um modo de degradação mais eficaz do que o efetuado por este agente oxidante, ou promover a sua atividade. As soluções contendo nanopartículas de prata, parecem não apresentar benefícios de forma significativa ou viável em termos de tempo, para a degradação do corante, como seria pretendido, pelo que não foi cumprido o objetivo de determinar uma via mais “verde” para a reação em estudo.

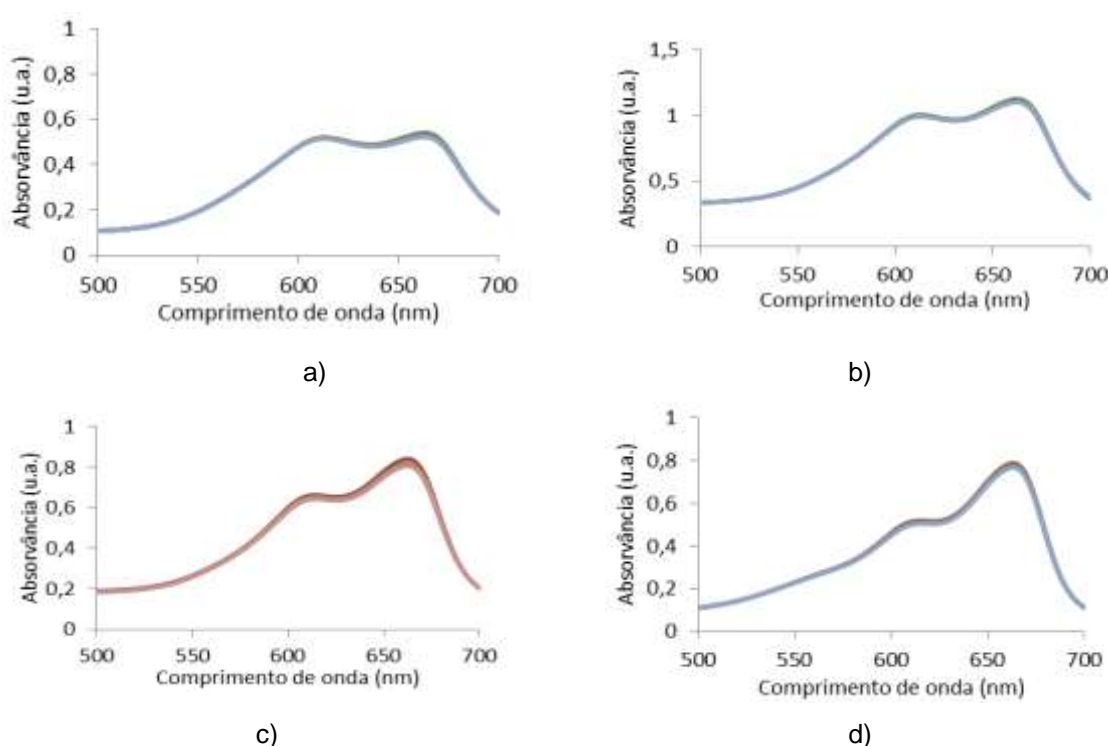


Figura 71 - Espectro de UV-Vis do ensaio da degradação do corante alaranjado de metilo, durante 20 minutos, por radiação UV na presença de a) extrato de **chá 1** a 1%; b) 1% AgNPs/**chá 1** ([catalisador] = $5,29 \times 10^{-5}$ M); c) 1% AgNPs/**chá 1** e H_2O_2 ([catalisador] = $2,65 \times 10^{-5}$ M [H_2O_2] = 0,14 M) e d) apenas H_2O_2 ([H_2O_2] = 0,28M). ([pigmento] = $1,21 \times 10^{-5}$ M)

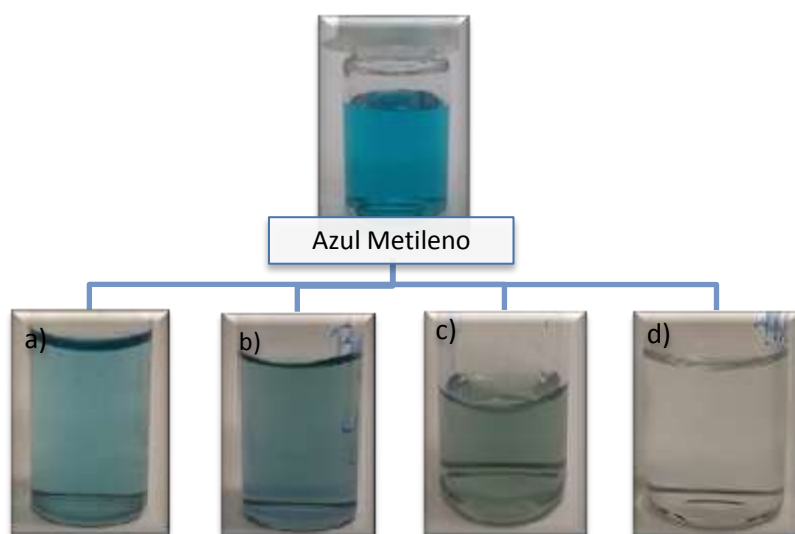
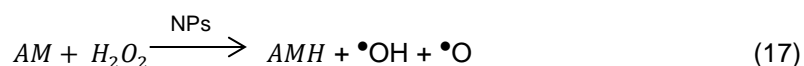


Figura 72 – Imagens da degradação do corante azul metileno, durante 5 horas, por radiação de luz solar na presença de a) extrato de **chá 1** a 1%; b) 1% AgNPs/**chá 1** ([catalisador]= $5,29 \times 10^{-5}$ M); c) 1% AgNPs/**chá 1** e H_2O_2 ([catalisador]= $2,65 \times 10^{-5}$ M $[H_2O_2]=0,14$ M) e d) apenas H_2O_2 ($[H_2O_2]=0,28$ M). ([pigmento] = $1,21 \times 10^{-5}$ M

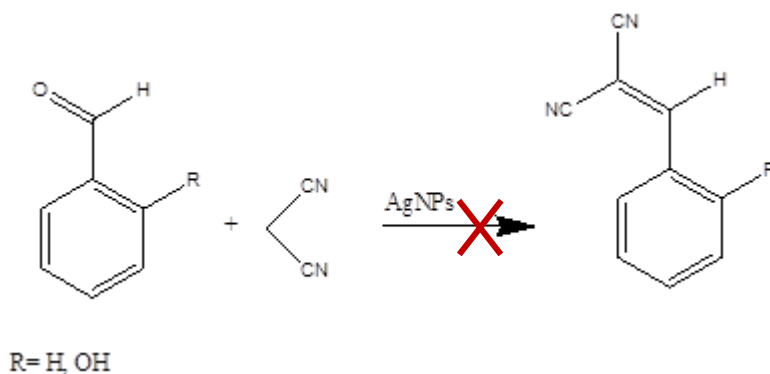
Pelos estudos efetuados verificou-se que os dois corantes estudados apresentavam comportamentos diferentes, para os ensaios efetuados, nomeadamente o corante azul metileno apresenta percentagens de descoloração superiores ao corante alaranjado de metilo. Foi reportado em estudos prévios que o mecanismo de degradação fotocatalítica para corantes aniônicos e catiónicos (alaranjado de metilo e o azul metileno, respetivamente) é bastante diferente.⁵⁶ Um possível mecanismo da degradação do azul metileno (AM), apresentado por Azmat *et al*¹⁴¹, com NPs de $CrO(OH)$, indicando que inicialmente a adsorção do corante ocorre à superfície do catalisador, onde interage com diferentes radicais, que levam à sua degradação. A adição de H_2O_2 à mistura do corante e NPs liberta radicais ($\bullet OH$, $\bullet OOH$), que possuem uma elevada capacidade de oxidação e que simultaneamente regeneram o catalisador, aumentando consequentemente a área superficial do catalisador onde o corante irá reagir (Equação 17).¹⁴¹



Os radicais livres gerados possuem uma elevada capacidade de oxidação, pelo que provocam oxidação destrutiva do corante orgânico. A presença destes radicais serão o provável motivo da mais rápida descoloração deste corante. A oxidação ocorre através de quebra das ligações C-C e a ligação S-O do azul metileno.

II.3.4.6– Condensação de Knoevenagel

Para este estudo pretendeu-se aplicar as AgNPs preparadas com extrato de **chá 1** na reação de condensação de Knoevenagel, como um método viável, “amigo do ambiente” e económico. Foi estudada a condensação Knoevenagel fotoquímica do malononitrilo com dois aldeídos diferentes, o benzaldeído e o 2-hidroxibenzaldeído (Esquema 4). Foi reportado um estudo semelhante, com a utilização de sumo de tamarindo por Pal⁵⁸, com elevados rendimentos em 2-7 min.



Esquema 4 – Esquema reacional da condensação de Knoevenagel do malononitrilo com os aldeídos aromáticos estudados.

Assim foram efetuados estudos com algumas variações das condições, para cada substrato, nomeadamente a presença ou ausência de 1% AgNPs/**chá 1**, o pH da solução (7 ou 3) e o modo de reação que variou entre apenas agitação, exposição à luz solar ou a radiação UV. Após a conclusão da reação foram efetuadas análises de ¹H-RMN, não tendo sido detetado o produto pretendido, levando à conclusão de que não ocorreu a reação desejada.

II.3.5– ESTUDOS DE LIGAÇÃO AO ADN

II.3.5.1– Análise por Espectroscopia de UV-Vis

Para as AgNPs sintetizadas também foi estudada a sua capacidade de ligação ao CT-DNA. Este estudo foi efetuado através da medição dos efeitos da interação das AgNPs com o CT-DNA por espectroscopia de UV-Vis. A ligação de compostos com o ADN usualmente resulta na visualização de efeitos de hipocromismo e batocrômicos. Este efeito resulta da forte interação entre as AgNPs com os pares de bases do ADN.¹¹⁶ Foram realizadas experiências de titulação das AgNPs numa solução tampão monitorizadas por análises de espectroscopia de UV-Vis, utilizando uma concentração fixa de AgNPs, às quais se adicionou, gradualmente, alíquotas de uma solução de ADN. A ligação das AgNPs ao ADN foi confirmada através desta análise e resultou na diminuição das intensidades da absorvância, com um ligeiro desvio para o vermelho (desvio batocrômico) (~3 nm) no espectro de absorção de UV-Vis (Figura 77). De modo a determinar a afinidade das AgNPs com o ADN, calculou-se a constante de ligação (K_b) das AgNPs, ao CT-DNA, através da monitorização das alterações do valor da absorvância a 270 nm, com o aumento da concentração de ADN.

O desvio hipocrômico fornece uma medida da força da ligação por intercalação. A constante K_b das AgNPs foi calculada como sendo $1,37 (\pm 0,49) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($s = 0,13$), valor que segue a mesma ordem de grandeza que se observa numa tendência hipocrômica. O tamanho do local de ligação (s) para as AgNPs é baixo ($s < 1$) o que sugere que a natureza da ligação é predominantemente pelos sulcos ou por agregação à superfície, das NPs, ao ADN, em preferência à ligação por intercalação.¹¹⁷ O desvio batocrômico da banda espectral, de ~3 nm, sugere que as AgNPs provavelmente interagem com o ADN por intercalação parcial ou através dos sulcos menores. O valor de K_b observado para as AgNPs é significativamente mais elevado do que os dos nanomateriais sintéticos ativos biologicamente¹⁴² e devido à sua maior solubilidade em meio aquoso. O valor da constante de ligação observado através do estudo UV-Vis indica que as AgNPs se intercalam fortemente ao núcleo do ADN, comparativamente com homólogos comerciais. No entanto é necessário recolher mais informação, de forma a ser possível caracterizar a interação entre as nanopartículas e o ADN.

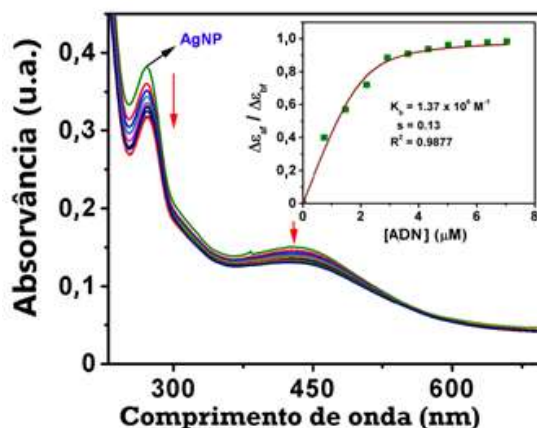


Figura 73 - Espectro de absorção das AgNPs (1,6 μM) na ausência e presença de quantidades incrementais de CT-DNA (0-7,5 μM) em 5 mM da solução tampão de Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5). A seta demonstra as variações na absorvância do complexo aquando a adição incremental da concentração de CT-DNA. A figura inserida demonstra uma curva de calibração de $\Delta\epsilon_{af} / \Delta\epsilon_{bf}$ versus [DNA] para as AgNPs.

II.3.5.1– Análise por Dicroísmo Circular

Os espectros de CD do CT-DNA (100 μM), na solução tampão (5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5)), foram analisados na presença de quantidades incrementais de AgNPs (Figura 78). O espectro de CD obtido para o CT-DNA apresenta uma banda positiva a 275 nm, devido ao empacotamento das bases e uma banda negativa a 245 nm devido ao enrolamento da hélice do ADN, que é característico para a forma B.¹²⁰ Foi verificado um aumento da banda positiva, bem como da banda negativa, que é devido à transformação da conformação B do ADN numa conformação semelhante à A.¹²¹ Os resultados revelam mudanças notórias induzidas pelas AgNPs, o que indica que ocorrem alterações conformacionais profundas na estrutura da dupla-hélice do ADN, devido à interação com as AgNPs.

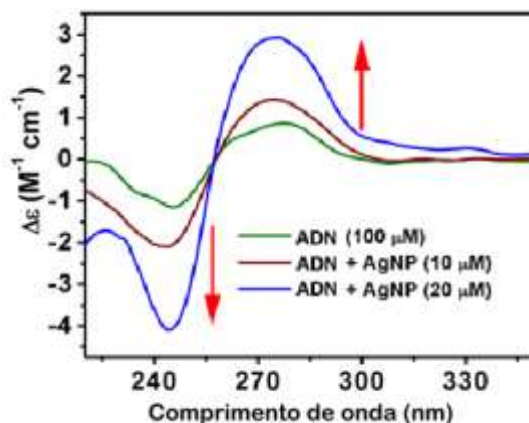


Figura 74 - Espectro de dicroísmo circular do CT-DNA na presença de quantidades incrementais de (0-20 μM) numa solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7.5). As setas indicam a tendência do espectro aquando a adição de ADN.

II.3.5.1– Análise por Espectroscopia de Fluorescência

Para este estudo foram examinadas, novamente, soluções contendo CT-DNA e brometo de etídio (BE) por titulação com AgNPs, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência.

A adição de uma segunda molécula que se ligue ao ADN irá extinguir a emissão de fluorescência do BE, ou por substituição do BE na sua ligação com o ADN (liga-se mais fortemente ao ADN que o BE) e/ou por aceitar eletrões no estado excitado do BE.¹²⁴ A extinção da fluorescência do BE ligado ao CT-DNA pelas AgNPs é demonstrada na Figura 79. A adição das AgNPs à solução CT-DNA com BE causa uma redução óbvia na intensidade de emissão, indicando que estas se ligam competitivamente com o BE, ao CT-DNA. Tal pode ser devido ao facto de as AgNPs interagirem com o ADN por intercalação, libertando assim algum BE do complexo. O valor da constante de extinção de Stern-Volmer, das AgNPs foi calculado como $1,15 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($R^2 = 0,988$). Isto também demonstra que a substituição parcial do BE ligado ao ADN por intermédio das AgNPs resulta num decréscimo da intensidade de fluorescência.

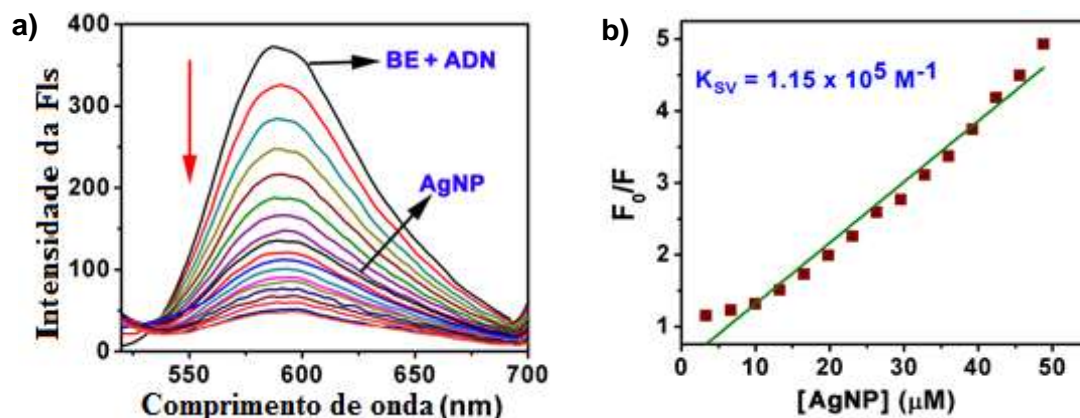


Figura 75 - a) Espectro de emissão de BE ligado ao ADN, numa solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5), na ausência e na presença de AgNPs. Condições reacionais: [BE] = 3,3 μ M, [DNA] = 40 μ M, [AgNP] = 0-220 μ M. (λ_{ex} = 510 nm). b) Representação gráfica da razão F_0/F vs [AgNPs] para a curva de extinção de fluorescência do ADN-BE, pelas AgNPs.

A concentração de AgNPs que se traduz numa redução de 50 % da intensidade de emissão do BE pode ser obtida a partir da Figura 79, onde 50 % das moléculas de BE ligadas ao ADN foram substituídas a uma razão de concentração de $\frac{[AgNPs]}{[BE]} = K1$. O valor K1 para as AgNPs foi determinado como 6,99. Sabendo que a constante de ligação do ADN para o BE é de $1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, a constante aparente de ligação do ADN das AgNPs ($k_{app} = 1,43 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) foi obtida a partir da equação $\frac{KB(BE)}{K1}$. O valor de k_{app} obtido indica que as AgNPs interagem com o ADN de forma eficiente, uma vez que o ambiente hidrofóbico dentro da hélice do ADN possivelmente reduz a acessibilidade das moléculas de água do solvente e a mobilidade do complexo fica restrita ao local da ligação.¹²⁶

II.3.5.2– Análise por Viscosidade

As medições de viscosidade foram realizadas de forma a esclarecer o modo de interação dos complexos metálicos ao ADN. Este modo de ligação normalmente apresenta como efeito um aumento significativo na viscosidade da solução de ADN, devido ao aumento da separação das pares de bases, nos locais de intercalação, provocando um aumento geral no comprimento do ADN.

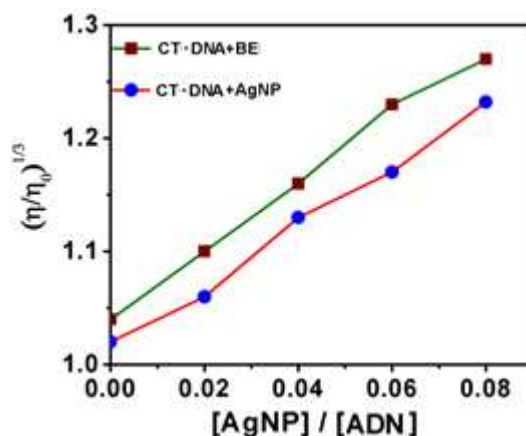


Figura 76 - Efeito de quantidades incrementais de BE e AgNPs, na viscosidade relativa do CT-DNA a 25 (± 0.1) °C. Concentração total de ADN de 0,5 mM.

Como demonstrado na Figura 80, com o aumento da razão [AgNPs] / [DNA] de 0,02 para 0,08, as AgNPs exibem uma tendência para o aumento da viscosidade relativa, o que sugere fortemente por intercalação, e que este será o principal modo de ligação quando as AgNPs interagem com o CT-DNA. O aumento da viscosidade relativa, é esperado que se correlacione com o potencial de intercalação das AgNPs-DNA, seguindo a ordem BE > AgNPs. Os estudos de viscosidade fornecem evidências da ligação por intercalação,¹²⁷ uma vez que o aumento da viscosidade do ADN é atribuído a este modo de ligação do composto e que tal provoca um aumento do comprimento efetivo do DNA.¹²⁸ O comprimento da parte linear do ADN na forma B é determinado pela espessura dos pares de bases que estão empilhados ao longo do eixo da hélice por forças de Van der Waals, entre si. Este resultado sugere que as AgNPs podem ligar-se fortemente ao ADN através de intercalação como o BE.

De notar que o comportamento observado para os estudos da ligação das NPs com o ADN, para o caso das AgNPs, obteve resultados muito semelhantes aos das AuNPs, tendo sido retiradas as mesmas conclusões.

II.3.6– ESTUDOS DE LIGAÇÃO A PROTEÍNA

Para as AgNPs também foram efetuados estudos sobre a sua interação com proteínas, tendo sido usada, à semelhança do efetuado para as AuNPs a albumina de soro bovino (BSA).

II.3.6.1– Análise por Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um método eficaz para examinar as interações entre os complexos metálicos e a BSA. A diminuição da intensidade de fluorescência da BSA é conhecida por ocorrer principalmente pela formação de um complexo entre o composto de extinção (aqui as AgNPs) e os fluoróforos da BSA¹³⁰ (resíduos de triptofano Trp-134 e Trp-212). A intensidade de emissão depende da exposição desses resíduos a um ambiente polar das proximidades e a grupos de extinção, como grupos carbonilo protonados, grupos imidazol e iões tirosinato.¹³¹ Com este estudo tencionou-se investigar a capacidade de ligação das AgNPs à BSA, sob condições fisiológicas.

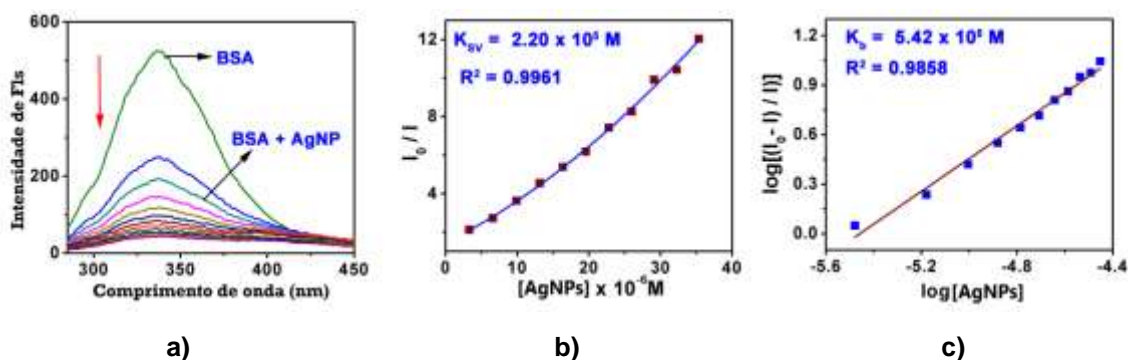


Figura 77 - a) Espectro da variação da fluorescência da BSA (1.0 μM) com o aumento da concentração de AgNPs (0-40 μM) na solução tampão de 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH = 7,5) (λ_{ex} = 280 nm); b) Representação gráfica da relação não-linear de Stern-Volmer da razão I_0/I vs. [AgNPs]; c) Representação gráfica da relação de Scatchard de $\log \frac{I_0-I}{I}$ vs. $\log [\text{AgNPs}]$.

O efeito das AgNPs na intensidade de fluorescência da BSA é demonstrado na Figura 81, a partir da qual se pode observar que a BSA possui uma forte banda de emissão de fluorescência a ca. de 337 nm quando excitada a 278 nm, e a intensidade de fluorescência da BSA é drasticamente reduzida após a adição das AgNPs. A adição das AgNPs à solução de BSA resulta na extinção da sua emissão de fluorescência, com um desvio para o vermelho significativo (desvio batocrômico) (~3 nm), possivelmente devido a mudanças na estrutura secundária / terciária da BSA que afeta a orientação dos resíduos de triptofano da proteína. Esta variação no pico de fluorescência característico da BSA, indica a sua interação com as AgNPs. O K_{SV} (constante de Stern-Volmer) do complexo foi calculado como $2,20 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a partir da equação de Stern-Volmer não-linear.

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q]) \quad (18)$$

A equação de Scatchard foi usada para calcular o número de locais de ligação (n) e a constante de ligação (K_b) de equilíbrio, como mostrado abaixo:

$$\log\left(\frac{I_0 - I}{I}\right) = \log K_b + n \log[Q] \quad (19)$$

O valor de K_b foi determinado a partir do declive do gráfico de $\log\left(\frac{I_0 - I}{I}\right)$ vs $\log[Q]$. Com base no gráfico, o valor de n para o ligando e para o complexo foi calculado como sendo ~ 1 , o que indicia a existência de um único local de ligação na proteína BSA. O K_b para as AgNPs foi calculado como sendo $5,42 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, este valor sugere que as AgNPs interagem fortemente com a BSA.

II.3.6.2– Análise por espectroscopia de absorção para a BSA

A espectroscopia de absorção é uma ferramenta importante para determinar o tipo de extinção da fluorescência, que geralmente são classificados como estáticos ou dinâmicos. Para o mecanismo de extinção dinâmica, o espectro de absorção do fluoróforo não é alterado, apenas o estado excitado do fluoróforo é influenciado pelos agentes de extinção, enquanto, por extinção estática, é formado um novo composto entre o estado fundamental do fluoróforo e o agente de extinção e, por conseguinte, o espectro de absorção do fluoróforo será significativamente influenciado.¹³² O espectro de absorção da BSA na ausência ou na presença de AgNPs é apresentado na Figura 82. As AgNPs também causam um aumento significativo relativamente à banda visualizada apenas para a BSA ($\sim 3,7$ vezes), com um pequeno desvio para o azul de ca. 3 nm. Este resultado revela a existência de uma interação estática entre BSA e as AgNPs.¹³³

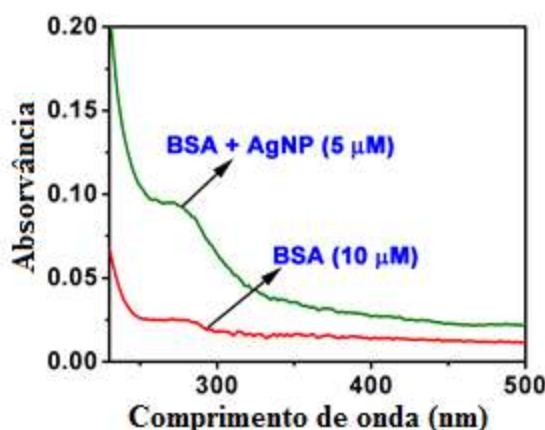


Figura 78 - Espectro de absorção de UV-Vis da BSA na ausência e na presença de AgNPs, na solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl (pH = 7,5).

II.3.6.3– Análise conformacional da BSA

As mudanças conformacionais da BSA foram examinadas através da medição da intensidade de fluorescência síncrona de fluoróforos, como resíduos de tirosina (Tir) ($\Delta\lambda = 15$ nm) ou triptofano (Trp) ($\Delta\lambda = 60$ nm).¹³⁴ O espectro é obtido através do estudo simultâneo da excitação e da emissão, mantendo o intervalo de comprimento de onda constante ($\Delta\lambda = 15$ ou 60 nm), entre eles.¹³⁵ Os espectros de fluorescência síncrona da BSA, com concentrações variáveis de AgNPs foram adquiridos a $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm e são demonstrados na Figura 83. O espectro de fluorescência síncrona da BSA, para $\Delta\lambda = 15$ nm, com quantidades variáveis de AgNPs apresentou um decréscimo na intensidade de fluorescência da banda a 286 nm (98%), com um notável desvio para o vermelho de 19 nm, o que indica que os complexos apresentam um efeito muito forte no microambiente dos resíduos de Tir. Os desvios para o vermelho, indicam o decréscimo do microambiente hidrofóbico e aumento do hidrofílico, dos resíduos de Tir da BSA. Do mesmo modo, a intensidade de fluorescência síncrona da BSA, para $\Delta\lambda = 60$ nm, também com a adição de quantidades incrementais de AgNPs, provoca uma diminuição acentuada da banda a 280 nm (96,74%) com um significativo desvio para o azul de 20 nm, o que indica que a conformação da BSA foi alterada de tal modo que a polaridade à volta dos resíduos de Trp diminui e a hidrofobicidade aumenta.¹³⁶

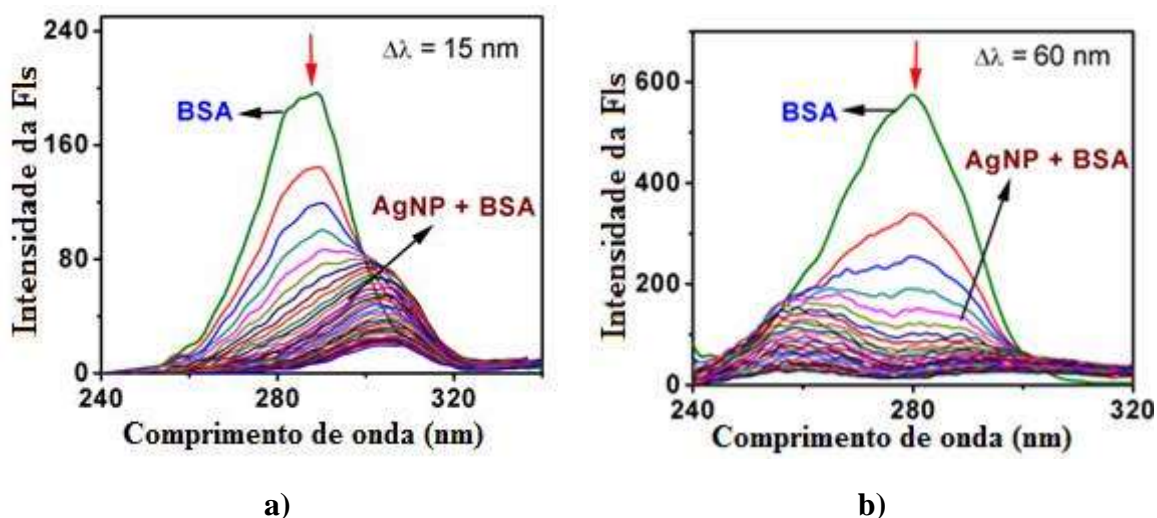


Figura 79 - Espectro síncrono da BSA (numa solução tampão de 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl, pH = 7,5), na presença de quantidades incrementais de AgNPs (0–50 μ M), a diferentes comprimentos de onda de a) $\Delta\lambda = 15$ nm b) $\Delta\lambda = 60$ nm. As setas demonstram a diminuição do valor de emissão, com o aumento da concentração de AgNPs.

III – PARTE EXPERIMENTAL

III.1– MATERIAIS E EQUIPAMENTO

Neste capítulo procede-se à descrição dos detalhes experimentais subjacentes à síntese de NPs e às técnicas utilizadas na sua caracterização e nas suas aplicações catalíticas e biológicas.

III.1.1– REAGENTES

Para o trabalho sintético realizado, as condições normalmente utilizadas foram a temperatura e pressão ambiente. As exceções são mencionadas no texto. Os solventes foram utilizados sem tratamentos adicionais. O 4-nitrofenol (4-NF) (Acros), 2-nitrofenol (2-NF) (BDH), nitrobenzeno (NB) (Acros), 4-aminofenol (4-AF) (Aldrich), 2-aminofenol (2-AF) (BDH), 2-, 3- e 4-nitroanilina (2-, 3- e 4-NA) (Fluka), 2-, 3- e 4- fenilenodiamina (2-, 3- e 4-FD) (Fluka), hidrobrometo de sódio (NaBH_4) (Acros), ácido ascórbico (Merck), d-glucose (Aldrich), cloreto de amónio (NH_4Cl) (Panreac), hidrazina (N_2H_4) (Analcara), ferrocianeto de potássio(III) (Aldrich) e ácido tetracloroaurico(III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (99.99%, Aldrich) foram obtidos comercialmente. Os chás utilizados no presente trabalho foram, o Chá preto da marca Tetley, o chá verde da marca Gorreana, Rooibos da marca Royal T-sick, a mistura de chá vermelho, fibras, ameixa e hibisco da marca Cem Porcento, comercializada com o nome "Peso Ideal" (nome que irá ser utilizado ao longo deste trabalho para referir esta mistura), a mistura de cavalinha, alcachofra, pilriteiro e urtiga verde da marca Pura vida do Pingo doce, denominada por "Drenagem" (nome que se utilizará para referir esta mistura), comercializados em Portugal e a mistura de dois chás pretos, Kenyan e Rwandan, da marca Marks & Spencer, denominada por "*Christmas tea*" (nome que se utilizará para referir esta mistura de chás), comercializado nas lojas da marca.

Tabela 15 – Designação a utilizar para os diferentes extratos de chá utilizados.

Extrato de chá	Designação
Tetley	Chá 1
"Christmas"	Chá 2
Verde	Chá 3
Rooibos	Chá 4
Peso ideal	Chá 5
Drenagem	Chá 6

III.1.2– EQUIPAMENTO

As NPs sintetizadas usando extratos de chá foram caracterizadas usando técnicas como microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia. A espectroscopia de UV-Vis também foi utilizada para a caracterização das NPs sintetizadas, bem como para os estudos efetuados, para as aplicações catalíticas e para os estudos biológicos.

III.1.2.1– Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy*– TEM) é a técnica mais comum de caracterização das NPs. Esta técnica é baseada num microscópio que opera com os princípios básicos de um microscópio normal, mas em vez emitir luz, emite um feixe de eletrões, na direção da amostra. Exibe imagens com uma resolução bastante maior, devido aos comprimentos de onda muito mais pequenos dos eletrões, comparativamente com os da luz. Este equipamento permite a observação de compostos na ordem dos Å (10^{-10} m) e permite obter uma fotografia do núcleo das NPs, pelo que é possível observar a sua forma e tamanho. As medições foram efetuadas num microscópio eletrónico de transmissão Hitachi H-8100, equipado com um detetor EDS da marca ThermoNoran e aquisição de imagem digital. As amostras em pó são analisadas através da sua deposição em grelhas de cobre.



Figura 80 – Equipamento de TEM do laboratório MicroLab do Instituto Superior Técnico (IST).¹⁴³

III.1.2.2– Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (*scanning electron microscopy* – SEM) é outra técnica muito utilizada, que produz imagens de alta resolução, com uma aparência tridimensional. A informação retirada inclui a morfologia externa (textura), a composição química, a estrutura cristalina e a orientação dos materiais na amostra. Esta técnica também é capaz de efetuar análises de pontos localizados da amostra, utilizando a técnica EDS (espectroscopia de raios-X por dispersão de energia), o que é muito útil para a determinação qualitativa e semi-quantitativa da composição química da amostra. As medições foram efetuadas num microscópio eletrônico de varrimento Hitachi S-2400 e um detetor EBSD da marca Oxford.



Figura 81 - Equipamento de SEM do laboratório MicroLab do Instituto Superior Técnico (IST)¹⁴³.

III.1.2.3– Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia

A espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX ou EDS) é uma técnica qualitativa e quantitativa microanalítica que fornece informação sobre a composição química da amostra. Os raios-X são detetados por um detetor de energia dispersiva que apresenta o sinal como um espectro ou histograma de intensidade versus a energia raio-X. As energias características dos raios-X permitem a identificação dos elementos da amostra, enquanto a intensidade dos picos permite a quantificação da concentração dos elementos. As medições foram efetuadas com um detetor de EDS da marca Bruker.

III.1.2.4– Difração de raios-X

A técnica de difração de raios-X é primariamente utilizada para a identificação da fase cristalina de um material, fornecendo informação sobre as dimensões da célula unitária. Para além disso, é possível caracterizar e determinar a pureza dos materiais. Esta técnica é muito importante, uma vez que através do conhecimento da estrutura de um composto é possível entender as suas propriedades físicas e químicas.¹⁴⁴

A pureza das nanopartículas sintetizadas foi determinada por esta técnica, efetuada à temperatura ambiente, num difractor X'pert PRO of PANalytical, com comprimento de onda Cu-K raios-X-rays, (λ) = 1.54056 Å.

III.1.2.5– Espectroscopia de Infravermelhos

A técnica de espectroscopia de infravermelhos (*infrared*, IR) opera com base na medição da transição entre os estados vibracionais das moléculas, que são induzidos através da irradiação da amostra com uma fonte de luz que emite na região do infravermelho. A maioria dos compostos apresenta um espectro com picos bem definidos a determinadas frequências, que corresponde a frequências vibracionais de grupos funcionais específicos ou a determinados tipos de ligação, presentes na amostra.¹⁴⁵

Esta técnica foi utilizada de modo a poder concluir sobre a formação das nanopartículas, através das alterações espectrais visualizadas. Para os estudos efetuados as amostra foram analisadas como pastilhas de KBr, num espectrómetro Bruker Vertex 40 Raman/IR de 4000 a 400 cm⁻¹.



Figura 82 – Equipamento de FTIR do Centro de Química Estrutural (IST).

III.1.2.6– Espectroscopia de UV-Vis

A técnica de espectroscopia de UV-Vis utiliza a luz na faixa de energias do visível e ultravioleta (200-700 nm), onde as moléculas sofrem transições eletrónicas moleculares. Esta técnica permite-nos estudar a absorção da luz na gama do UV-Vis das soluções em função do comprimento de onda. A radiação atravessa toda a gama do UV-Vis e analisa a amostra, durante aproximadamente 30 segundos. O equipamento deteta a radiação transmitida e regista a absorção, corrigindo as intensidades de radiação da amostra com a da célula de referência.¹⁴⁶

No presente estudo as amostras analisadas por esta técnica encontravam-se no estado líquido, e posteriormente foram colocadas em cuvetes de quartzo com 1 cm de percurso ótico. Esta técnica foi utilizada para o estudo de várias aplicações das nanopartículas foram efetuados medições de espectroscopia de UV-Vis num espectrofotómetro da marca PerkinElmer, modelo Lambda 35.



Figura 83 – Espectrofotômetro de UV-Vis do Centro de Química Estrutural, IST.

III.1.2.7– Espectroscopia de Fluorescência

Este tipo de espectroscopia tem a função de medir a fluorescência de uma amostra, que depende dos grupos fluorescentes que contem. Estes equipamentos possuem um monocromador que é usado para selecionar o comprimento de onda de excitação, que depende da amostra (neste caso utilizou-se 280 nm, comprimento de excitação dos resíduos de Trp). Os slits (aberturas) de emissão e excitação foram selecionados de modo a maximizar a intensidade de fluorescência de cada amostra.¹⁴⁷

O espectro de emissão apresenta as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, enquanto o espectro de excitação mostra as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda da luz de excitação. Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados espectrofotômetro da marca PerkinElmer, modelo LS 55, onde foram utilizadas células de quartzo com 1 cm de percurso ótico. Os espectros foram traçados de 240 a 340 nm.



Figura 84 - Espectrofotômetro de Fluorescência do Centro de Química Estrutural, IST.

III.1.2.8– Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Esta técnica tem especial utilidade para estudar a estrutura de moléculas, interações entre elas, para além da sua cinética ou dinâmica e também é possível estudar a composição de várias misturas. Esta técnica permite a análise de tamanhos de moléculas, muito variados (desde moléculas orgânicas muito pequenas, até proteínas com peso molecular da ordem dos kDa).¹⁴⁸

As análises por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C foram efetuadas com a adição de dimetoxietano e clorofórmio deuterado e registados num espectrómetro Bruker AVANCE III 400 MHz.

III.1.2.9– Espectroscopia de Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) é propriedade de alguns materiais possuem de absorver a luz de diferente modo, dependendo da forma da polarização, do feixe incidente. A análise de amostras por dicroísmo circular é baseada na quiralidade do composto, em solução. Permite a caracterização de centros estéreos, em compostos químicos, para além de permitir retirar informação sobre a conformação de proteínas e interação entre estas ou o ADN, com outros compostos químicos.¹⁴⁹

Os espectros de CD foram traçados num espectropolarímetro Jasco J-720 que mede o espectro de dicroísmo circular numa gama de 180-1000 nm.

III.1.2.10– Viscosidade

A viscosidade de um fluido é a resistência deste à alteração da sua forma ou a resistência a movimentos internos das suas moléculas constituintes. Esta é dependente de vários fatores, nomeadamente a temperatura e a composição química do fluido. Assim, analisando a viscosidade de um fluido é possível retirar informação sobre alterações que ocorreram nas moléculas do fluido.

As medições de viscosidade foram efetuadas num viscosímetro da marca Ubbelodhe, em banho termostático à temperatura constante de 25°C.

III.2– PROCEDIMENTOS

III.2.1– PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO UTILIZANDO EXTRATOS DE CHÁ

A preparação de AuNPs utilizando extratos de chá, foi efetuada com base no método previamente descrito.⁷³ A solução de chá foi preparada a partir de dois tipos diferentes de folhas ou mistura de folhas de chá, com 100 mL de água destilada, seguida de agitação vigorosa durante 15 minutos à temperatura ambiente. Depois da suspensão ser filtrada, diferentes quantidades desta solução de chá foram transferidas para um frasco de vidro e o volume completado com água destilada até perfazer um volume de 6mL, de forma a obter 3 soluções com diferentes percentagens de chá (1, 5 ou 10 %). A cada um deles foi adicionado 0,1 mL de uma solução 0,1 M de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e agitou-se durante 20 minutos à temperatura ambiente. Para as 1% AuNPs observou-se que a solução mudou da cor amarela, para bordeaux, quase instantaneamente, indicando a formação de AuNPs, devido à ocorrência das bandas de ressonância de superfície de plasmão (SPR) características das AuNPs na região do visível.

III.2.2– PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO EXTRATOS DE CHÁ

III.2.2.1– Método Simples

A preparação de AgNPs utilizando extratos de chá, foi efetuado de modo homólogo ao do ouro e com base no método previamente descrito.⁷³ Foram utilizados diferentes tipos de chá como chá preto Tetley, “Christmas tea”, Rooibos, chá verde, “peso ideal” e “drenagem”. Foram adicionados os diferentes tipos de chá a 50 mL de água destilada, de modo à solução apresentar uma concentração de 1% de chá, que em seguida foi colocada em agitação vigorosa durante 15 min à temperatura ambiente. Em diferentes volumes de 6 mL das soluções de diferentes extratos de chá, foi adicionado 0,1 mL de uma solução 0,1 M de AgNO_3 e agitou-se à temperatura ambiente. A agitação decorre até à mudança de cor da solução ser observável.

III.2.2.2– Método por irradiação microondas ou por ultrassons

A síntese das AgNPs assistida por microondas e ultrassons tem dois maiores propósitos, a redução do tempo da síntese e o controlo do diâmetro das nanopartículas de prata. Numa síntese típica utilizando ultrassons, a preparação das AgNPs usando extratos de chá 1% e a solução 0,1 M de AgNO_3 foi efetuada utilizando o método simples, onde a solução foi imersa num banho de ultrassons (operando a um frequência de 20 kHz e com uma potência de $2,5 \text{ W/cm}^2$) durante 1-3h, durante o qual foi obtida uma mistura cinzento-acastanhada.

As AgNPs também foram preparadas usando irradiação microondas (MW) e um extrato aquoso de chá 1% sob as condições típicas de 35 ou 150°C, (5-20 W), para 1-3h de tempo de reação.

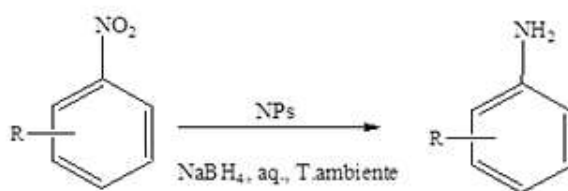
O facto de se realizar a síntese das AgNPs sobre a irradiação microondas é expectável que influencie o crescimento e a forma das AgNPs estudadas. As técnicas de Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) e espectro de UV-Vis foram utilizadas para caracterizar a uniformidade do tamanho e da forma das nanopartículas de prata efetuadas por micro-ondas. A síntese das AgNPs sob irradiação microondas (MW) foi efetuada num reator *Anton Paar Monowave 300*, com radiação microondas focada e um detetor de temperatura de infravermelhos, usando um tubo reacional com capacidade de 10 mL, com um diâmetro interno de 13 mm.

III.2.3– TESTES BIOQUÍMICOS PARA DETEÇÃO DE FLAVONÓIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS

Para determinar a presença de polifenóis no chá, foram adicionadas várias gotas de cloreto de ferro 5 % a 2 mL de extrato de chá. O aparecimento da cor verde-escuro indica a presença de compostos polifenólicos.

Para os flavonóides misturou-se 5 mL da solução diluída de amónia, com 2 mL do extrato de chá e adicionou-se várias gotas de ácido sulfúrico, concentrado. O aparecimento da cor amarela indica a presença de flavonóides.

III.2.4– REDUÇÃO DE COMPOSTOS NITRO, EM MEIO AQUOSO



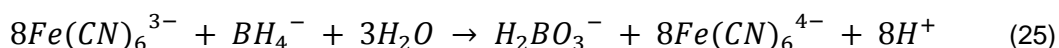
Esquema 5 – Esquema reacional genérico da redução dos compostos nitroaromáticos, na presença de nanopartículas, utilizando como agente redutor o NaBH_4 , à temperatura ambiente.

As reações de redução destes compostos foram realizadas em cuvetes padrão de quartzo de 3 mL com comprimento de 1 cm de percurso. As soluções aquosas de 4-nitrofenol ($1,2 \times 10^{-3}$ M) e NaBH_4 (0,1 M) foram preparadas para cada experiência de modo a minimizar a hidrólise. Foi preparada uma solução de 2,5 mL de água e 0,5 mL da solução de chá (1, 5 ou 10%), desta solução foram retirados 0,5 mL que foram adicionados à cuvete, juntamente com 2,5 mL de água, 100 μL do composto nitro (2- ou 4-nitrofenol, 2-, 3- ou 4-nitroanilina ou nitrobenzeno) e finalmente 50 μL da solução 0,1 M de NaBH_4 . A absorvância do espectro UV-Vis foi medida de 200 a 700 nm e em

intervalos de 2 minutos. A atividade catalítica foi quantificada em termos de conversão do substrato e da atividade do catalisador (*turnover frequency, TOF*) considerando que o 2- ou 4-aminofenol, 2-, 3- ou 4-fenilenodiamina e anilina são os únicos produtos de redução.

Testes em branco, sob as mesmas condições reacionais, mas na ausência de nanopartículas metálicas foram também realizados. Para estes estudos não foi observado conversão dos compostos nítro.

III.2.5– REDUÇÃO DO HEXACIANO FERRATO (III), EM MEIO AQUOSO



A reação catalítica foi efetuada em cuvets de quartzo, de 3 mL com 1 cm de percurso. Foi preparada uma solução de 2,5 mL de água e 0,5 mL de solução de chá 1% com AuNPs. 0,5 mL desta solução contendo nanopartículas foi colocada dentro da cuvete e adicionou-se 2,5 mL de água destilada. A esta solução foi adicionado 0,1 mL da solução (3×10^{-2} M) de hexacianoferrato(III) e finalmente 50 μL da solução 0,1 M de NaBH_4 . O espectro de absorção de UV-Vis foi registrado de 200 a 700 nm e em intervalos de 2 min.

III.2.6– DEGRADAÇÃO DE CORANTES, EM MEIO AQUOSO

A degradação de corantes foi estudada para dois compostos diferentes, o alaranjado e de metilo e o azul metileno. Esta foi testada por dois métodos distintos, onde um envolve exposição à luz solar e o outro, exposição à radiação ultravioleta (UV).

Pretendeu-se estudar o efeito das AgNPs na degradação dos dois pigmentos, através da observação da sua ação na presença e na ausência do agente oxidante (H_2O_2). Em ambos os métodos foram estudadas diferentes soluções aquosas, com os dois corantes, nas quais se adicionou apenas chá 1% (sem AgNPs), chá com AgNPs ou H_2O_2 , ou a mistura de chá com AgNPs e H_2O_2 .

Os ensaios foram efetuados num volume de 3,1 mL onde se adicionou 300 μL da solução $1,2 \times 10^{-4}$ M de pigmento e 100 μL de chá com ou sem AgNPs ou de H_2O_2 (30%). Para os ensaios em que se utilizou mistura de chá com AgNPs e agente oxidante, foram utilizadas quantidades equitativas (50 μL) de cada.

Os ensaios com radiação UV foram efetuados através de varrimentos sucessivos, no espectrofotómetro de UV-Vis, durante 5 minutos, em que, posteriormente, os scans foram sobrepostos para verificar a degradação conseguida.

Para os ensaios à luz solar, as soluções efetuadas foram iguais às dos ensaios UV, mas estas foram expostas à luz solar durante aproximadamente 5 horas. Para o pigmento azul metileno, foram ainda efetuados estudos onde se variou o rácio da mistura catalisador (AgNPs) e agente

reduzidor (H_2O_2), adicionando maiores quantidades de um ou do outro composto (20 μL de chá 1% com AgNPs e 80 μL de H_2O_2 e o inverso, 80 μL de chá 1% com AgNPs e 20 μL de H_2O_2).

III.2.7– CONDENSAÇÃO DE KNOEVENAGEL

A reação catalítica de condensação de Knoevenagel é realizada através da mistura de um aldeído, malononitrilo e catalisador. Nos estudos efetuados utilizaram-se o benzaldeído e o 2-hidrobenzaldeído. Foram adicionadas 5 mmol do aldeído e 5 mmol de malononitrilo a 2,5 mL da solução de extrato de chá Tetley 1% com AgNPs. A reação foi estudada, com agitação, na presença e na ausência de irradiação da luz visível e para valores de pH de 7 ou 1. Após o término da reação, os produtos foram analisados por RMN.

III.2.8– ESTUDOS BIOLÓGICOS – LIGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS À ESTRUTURA DO ADN

Foi preparada uma solução de 1 mg de ADN de timo de vitela (*calf thymus DNA*, CT-DNA) em 1 mL de uma solução tampão de tris-HCl-NaCl (pH=7,5). Para ajudar à dissolução do ADN na solução recorreu-se à técnica de ultrassons. Preparou-se uma solução com 200 μL da solução anterior e 2,8 mL da dita solução tampão, que foi analisada por UV-Vis, de onde foi possível retirar a informação necessária para o cálculo da concentração do ADN nessa solução (referida como OS) e para a determinação da sua pureza. A concentração de ADN na solução OS é de $3,66 \times 10^{-4} \text{ M}$ e verificou-se que o ADN se encontrava puro.¹⁵⁰

III.2.8.1– Análise por Espectroscopia de UV-Vis

A concentração do CT-DNA foi determinado através da sua intensidade de absorção ao comprimento de onda de 260 nm com um valor de ϵ^{151} de $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pelo método descrito anteriormente.¹⁵⁰ Para os ensaios da ligação do ADN às nanopartículas, recorreu-se à técnica de espectroscopia de UV-Vis, onde inicialmente se adicionou na cuvete 50 μL da solução de extrato 1% do chá 1 (Tetley) com nanopartículas (de ouro ou de prata) e 2,95 mL da solução tampão. Após o scan desta solução, foram-se adicionando tomas de 40 μL da solução OS, em ambas as células, de amostra e de referência, até se atingir o ponto de saturação (técnica de titulação), observado pela sobreposição dos scans para cada adição.

A constante de ligação K_b intrínseca foi determinada a partir dos dados espectrais obtidos, utilizando a seguinte equação:¹⁵²

$$\frac{\epsilon_a - \epsilon_f}{\epsilon_b - \epsilon_f} = \frac{b - \left(\frac{b^2 - 2K_b^2 C_t [\text{ADN}]}{s} \right)^{1/2}}{2K_b C_t} \quad (26)$$

$$b = \frac{1 + K_b C_t + K_b [ADN]}{2s} \quad (27)$$

Onde [ADN] é a concentração de CT-DNA, ϵ_a é o coeficiente de extinção aparente do composto na presença de uma certa quantidade de CT-DNA, ϵ_f é o coeficiente de extinção do composto (nanopartículas) livre, ϵ_b é o coeficiente de extinção final do composto ligado ao DNA, na sua máxima extensão, K_b é a constante de equilíbrio da ligação em M^{-1} , C_t é a concentração total do composto e s é o parâmetro de ajuste, que fornece uma estimativa do tamanho do local de ligação, nas pares de bases. A análise de ajuste não-linear, foi realizada usando o *software* Origin Lab, versão 6.1.

III.2.8.2– Análise por Espectroscopia de Fluorescência

O método de espectroscopia de fluorescência foi efetuado, utilizando brometo de etídio (BE) como referência, de modo a ser possível determinar as propriedades da ligação ao DNA das AgNPs, numa solução tampão de 5 mM Tris HCl/50 mM NaCl, pH= 7,5.

Foi preparada uma solução contendo 200 μ L da solução OS e 2,8 mL da solução tampão. Após o scan desta solução adicionou-se 8 μ L do composto BE e efectuou-se um novo scan. Posteriormente foram adicionadas tomas de 5 μ L de uma solução 1 mM de extrato de chá com nanopartículas de ouro ou prata, até se atingir o ponto de saturação, que é observado pela sobreposição dos scans após cada adição. A intensidade de fluorescência do BE a 605 nm, com um comprimento de onda de excitação de 510 nm, foi medida para diferentes concentrações de AgNPs.

Foi observada uma redução na intensidade de emissão, com a adição das AgNPs. A tendência de ligação relativa (K_1) das AgNPs ao CT-DNA foi determinada a partir do declive da representação gráfica da intensidade de fluorescência vs. concentração AgNPs. A constante de ligação aparente (k_{app}) foi calculada usando a equação $\frac{K_{EB}[BE]}{K_1}$, onde a concentração do composto foi o valor da redução de 50% da intensidade de fluorescência de BE e $K_{BE} = 1,0 \times 10^7 M^{-1}$ ($[BE] = 3,3 \mu M$).¹⁵³

III.2.8.3– Medições de Viscosidade

As medições de viscosidade foram realizadas utilizando um viscosímetro da marca Ubbelodhe mantendo a temperatura constante de $25,0 \pm 0,1$ °C, num banho termostático. As amostras de ADN de aproximadamente 200 bp (pares de bases) de comprimento foram preparadas por ultrassons, de forma a tentar reduzir a complexidade do ADN que deriva da sua flexibilidade.¹⁵⁴ O caudal foi medido com um cronómetro digital e cada amostra foi testada três vezes, de modo a se calcular o tempo médio. Os dados foram apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs razão de ligação,¹⁵⁵ η é a viscosidade de ADN na presença de AgNPs e η_0 é a viscosidade de ADN livre.

III.2.9– ESTUDOS BIOLÓGICOS – LIGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS A PROTEÍNAS

Foi preparada uma solução de 1 mg da proteína BSA (albumina do soro bovino) em 1 mL de uma solução tampão 5 mM Tris HCl/50 mM NaCl (pH=7,5). Preparou-se uma solução com 50 µL da solução anterior e 2,95 mL da solução tampão ([BSA] = $1,5 \times 10^{-2}$ M). Após o scan da solução anterior procedeu-se à adição de tomas de 10 µL de uma solução 1 mM de extrato 1% de chá 1 com nanopartículas de ouro ou de prata. Os estudos foram efetuados aos comprimentos de onda de excitação e emissão da BSA de 280 e ~ 348 nm. Os estudos espectrais de fluorescência síncrona foram realizados a dois valores distintos de $\Delta\lambda$ (diferença entre o λ_{ex} e λ_{em} de BSA), sendo estes 15 e 60 nm, utilizando uma concentração semelhante de BSA e dos outros compostos.

IV– CONCLUSÕES

O trabalho experimental realizado teve como objetivo sintetizar nanopartículas (NPs) de Au e Ag por uma via ecológica, utilizando diferentes extratos de chá com especial relevância para o chá preto. O polifenóis e os flavonóides presentes na composição do chá desempenham funções de agente redutor e estabilizante.

Foram estudadas as dimensões e a morfologia das nanopartículas obtidas a partir de diferentes tipos de chá e foi também estudada a influência da concentração de chá, na sua atividade catalítica.

Foram utilizadas diferentes técnicas de caracterização, nomeadamente as técnicas SEM e TEM, para observar a superfície das nanopartículas e determinar o seu diâmetro e forma. Por XRD foi possível atribuir uma estrutura cristalina às AuNPs e às AgNPs e foi também possível concluir sobre a sua pureza. A espectroscopia de UV-Vis foi também utilizada na caracterização das NPs, funcionando como uma técnica expedita para confirmar a formação das NPs, através do aparecimento da banda SPR característica, bem como indicar acerca do seu tamanho e dispersão em solução. Realizaram-se estudos de estabilidade dos extratos de chá com as NPs e concluiu-se que as soluções mantêm a sua estabilidade pelo menos durante 3 semanas, sem a presença de agentes estabilizantes adicionais.

Foi avaliada a atividade catalítica das NPs em diferentes sistemas catalíticos, nomeadamente na redução de uma grande variedade de compostos nitro e na redução do hexacianoferrato. Todas as NPs produzidas foram testadas na reação modelo, redução do 4-nitrofenol, de modo a ser possível avaliar uma possível aplicação noutras reações de redução. As AgNPs, foram ainda estudadas na oxidação de corantes e na condensação de Knoevenagel de aldeídos. Para além de estudos catalíticos foram realizados estudos biológicos, sendo avaliada a capacidade das NPs se ligarem ao ADN e a proteínas, com vista a possíveis aplicações biológicas.

Demonstrou-se que é possível sintetizar, com sucesso, NPs de Au e Ag, utilizando diferentes extratos de chá como agente redutor e estabilizante. Foi verificado que diferentes extratos de chá originam partículas com diferentes tamanhos e formas. Também foi testada a influência da utilização de diferentes métodos de síntese, nomeadamente o recurso a irradiação por microondas ou ultrassons, na produção de AgNPs.

Para os estudos catalíticos de redução de compostos nitro, realizados na presença de AgNPs, concluiu-se que as AgNPs produzidas recorrendo a irradiação microondas a 35 °C (com o extrato de chá 1) são as mais ativas.

Relativamente ao sistema catalítico envolvendo AuNPs, verificou-se que as NPs obtidas a partir de extrato de chá 1 a 1% foram as mais ativas e inclusive verificou-se que a conversão dos compostos nitro é feita com a necessidade de menos tempo de reação quando comparado com outros resultados reportados. De notar que para o mesmo sistema catalítico, as AuNPs mostraram-se bem mais reativas que a AgNPs, obtendo-se conversões maiores com menor tempo de reação.

A aplicação de AgNPs na oxidação de pigmentos não foi bem sucedida, possivelmente pela ação do chá que também possui propriedades corantes e redutoras. Assim, mais estudos teriam de ser realizados, utilizando nomeadamente extratos de chá com propriedades oxidantes, ou outro composto natural, para a síntese das nanopartículas, não corante e oxidante.

Para a condensação de Knoevenagel, não se verificou a reação expectável possivelmente porque as condições mais favoráveis para esta reação, com base na literatura⁵⁸ são condições muito ácidas, pH entre 1 ou 2, pelo que se conclui que nestas as nanopartículas testadas são inativas, possivelmente pela destruição dos produtos naturais que o chá contem e consequente aglomeração e desativação das nanopartículas metálicas presentes nesse tipo de solução.

Foram realizados estudos biológicos em que foi estudada a interação das nanopartículas sintetizadas com o ADN, tendo-se obtido resultados similares para ambas as nanopartículas metálicas testadas. Os resultados revelaram que a interação entre estes compostos é eficaz e que ocorre através do modo de intercalação.

Também foi estudada a ligação das NPs (AuNPs e AgNPs) com proteínas (moléculas de BSA), onde os resultados experimentais mostram que estas se ligam às moléculas de BSA, extinguindo eficientemente a sua fluorescência através de um mecanismo de extinção estático. Os resultados experimentais sugerem ainda que a ligação efetuada é moderadamente forte e indicam a existência de um único local de ligação. Foi possível concluir também, por espectroscopia de fluorescência síncrona, que ambas as NPs estudadas apresentam igual acessibilidade aos resíduos de Trp e Tir da molécula de BSA.

V – PERSPETIVAS FUTURAS

A utilização de nanopartículas metálicas produzidas por extratos naturais, ainda se encontra relativamente pouco explorada, em diferentes áreas da Química e da Física. De referir que todos os processos implementados deveriam apresentar uma elevada consciência ambiental, beneficiando as metodologias mais verdes. Nesse sentido, o método proposto no presente trabalho, pode ser explorado de forma a ser inserido ou a otimizar processos de algumas aplicações industriais e comerciais.

Como perspetivas futuras, uma área de interesse será o teste de soluções contendo nanopartículas metálicas em permutadores de calor, de modo a tentar melhorar a sua eficácia, no processo de transferência de calor. Para esta aplicação, ter-se-ia de se proceder a estudos de caracterização termofísicos e termodinâmicos, de modo a avaliar a capacidade real de permuta de calor das soluções, contendo nanopartículas metálicas. Estudos realizados por outros autores que utilizam nanopartículas de prata e permutadores de fluxo linear demonstram um aumento da eficiência de transferência de calor devido à presença de um metal com elevada condutibilidade térmica.¹⁵⁶

Em termos catalíticos, a aplicação das AuNPs está a ser desenvolvida com bastante sucesso¹⁵⁷ e a sua aplicação em reações catalíticas de interesse industrial, ainda está a ser estudada. Assim, partículas de tamanho nanométrico produzidas pelo método como o estudado no presente trabalho, podem ser vantajosas neste tipo de aplicação, uma vez que a sua produção é feita de um modo ambientalmente consciente.

A aplicação de AuNPs em campos da Física como células solares, é outra área de interesse a ser testada, já que as nanopartículas têm uma área superficial muito elevada, tornando-as potencialmente mais eficientes.

Para concluir, relativamente às AuNPs, a sua aplicação na área da medicina tem demonstrado a sua importância no tratamento de doenças, como o cancro, Alzheimer ou Parkinson.^{158,159,160}

No caso das AgNPs, a sua aplicação em reações catalíticas de redução, oxidação e condensações ainda se encontra em desenvolvimento. A utilização de processos com origem natural, na síntese de nanopartículas metálicas, com potencial catalítico é uma área dentro da catálise que só agora se está a começar a desenvolver, pelo que os estudos iniciados com este trabalho potencialmente, no futuro, podem resultar em novas aplicações catalíticas.

A prata é conhecida pela sua ação anti-bacteriana, pelo que estudos com nanopartículas desenvolvidas por processos não tóxicos são, num futuro próximo, uma abordagem complementar aos estudos médicos e farmacológicos que usualmente são desenvolvidos no combate e doenças degenerativas.

Para terminar, para além das potenciais aplicações com os metais estudados, existem inúmeras aplicações que podem ser estudadas, inclusivamente as referidas nestes trabalhos, com nanopartículas produzidas com outros metais, nomeadamente ferro e cobre. Estes metais apresentam outras características e propriedades muito interessantes, relativamente ao ouro ou a prata, que os tornam extremamente atrativos para outras aplicações.

VI – COMUNICAÇÕES

No decorrer deste trabalho foi possível a sua divulgação através de comunicações em Encontros Científicos e publicadas em livros de resumo, quer através de comunicações orais ou por painel. Encontram-se também em fase de submissão 3 artigos científicos.

PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS SUJEITAS A AVALIAÇÃO PRÉVIA

Alegria, E.C.B.A.; Ribeiro, A.P.C.; Mendes, M.; Pombeiro, A.J.L. "Green synthesis of gold nanoparticles using tea extracts in aqueous solution and their application in catalytic reductions of aromatic nitro compounds", *Environ. Sci. Technol.*, *submitted*.

Ribeiro, A.P.C.; Anbu S.; Alegria, E.C.B.A.; Mendes, M.; Silva, M.F.C.G.; Pombeiro, A.J.L.; "Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Microwave and Ultrasonic methods in Aqueous Media and applications in DNA, BSA binding and nitrophenol reduction catalysis", *to be submitted*.

Alegria, E.C.B.A.; Anbu, S.; Ravishankaran, R.; Ribeiro, A.P.C.; Mendes, M.; Silva, M.F.C.G. Anjali A. Karande, A.A.; Pombeiro, A.J.L. "DNA, BSA binding, cytotoxicity, electrochemical studies and catalytic application in the reductions of hexacyanoferrate(III) of gold nanoparticles produced in tea", *to be submitted*.

COMUNICAÇÕES ORAIS

Mendes, M.; Ribeiro, A.P.C.; Alegria, E.C.B.A.; Pombeiro, "Green Synthesis of Gold Nanoparticles and Catalytic Properties for the Reduction of Aromatic Nitro Compounds", 2nd EuCheMS Congress on Green and Sustainable Chemistry, Faculty of Sciences and Technology of the Nova University of Lisbon, October 4-7 **2015**, Lisbon, Portugal. O20-2

COMUNICAÇÕES POR PAINEL

Alegria, E.C.B.A.; Domingos, C.; Mendes, Pombeiro, A.J.L., Rhenium(III)-based scorpionate complexes in the Baeyer-Villiger oxidation of ketones: An electrochemical approach", 20th Meeting of the Portuguese Electrochemical Society, Universidade do Minho, October 21-23, **2015**, Braga, Portugal.

Mendes, M.; Anbu, S.; Alegria, E.C.B.A.; Ribeiro, A.P.C.; Pombeiro, A.J.L., Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous tea extracts and applications in DNA, BSA binding and nitro compounds reduction catalysis, 2nd EuCheMS Congress on Green and Sustainable Chemistry, Faculty of Sciences and Technology of the Nova University of Lisbon, October 4-7 **2015**, Lisbon, Portugal. P87

Mendes, M.; Ribeiro, A.P.C.; Alegria, E.C.B.A.; Pombeiro, A.J.L. "Green synthesis of gold nanoparticles using tea extracts", Fórum de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, May 27-29, **2015**, Lisbon, Portugal. P17

VII – BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Horikoshi, S.; Serpone, N.; "Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications", Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2013**
- ² Iravani S.; Korbekandi H.; Mirmohammadi S. V.; Zolfaghari B.; Res. Pharm. Sci, **2014**, 9(6), 385-406
- ³ Moreno-Mañas, M.; Pleixats, R.; Acc. Chem. Res. **2003**, 36, 638-643
- ⁴ Ren, X.; Meng, X.; Chen, D.; Tang, F.; Jiao, J. Biosens. Bioelectron. **2005**, 21, 433-437.
- ⁵ Liz-Marzán, L.M.; Langmuir **2006**, 22, 32-41.
- ⁶ Daniel, M.C.; Astruc, D.; Chemical Reviews, **2004**, 104, 293-346.
- ⁷ Dykmana, L.; Khlebtsov, N.; Chem. Soc. Rev., **2012**, 41, 2256-2282.
- ⁸ Rodriguez-Lorenzo, L.; Rica, R.; Alvarez-Puebla, R.A.; Liz-Marzan, L.M.; Stevens, M.M. Nat. Mater, **2012**, 11, 604-607.
- ⁹ "the Nano Timeline – a big history of the very small", American Chemistry Council (<http://nanotechnology.americanchemistry.com/Nanotechnology-Timeline> consultado a 18 Agosto)
- ¹⁰ Henglein, A.; Chem. Rev. , **1989**, 89 , 1861 – 1873 .
- ¹¹ Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M.A.; Chem. Rev., **2005** , 105 , 1025 – 1102.
- ¹² (a) Wood, R.W.; Proc. Phys. Soc.London , **1902**, 18 , 269 – 275 ; (b) Wood, R.W.; Philos. Mag. , **1902**, 4 , 396 – 402 ; (c) Wood, R.W.; Philys. Mag., **1912**, 23, 310 – 317.
- ¹³ Otto, A.; Z. Phys. , **1968**, 216 , 398 – 410.
- ¹⁴ Kretschmann, E.; Raether, H; Z. Naturforsch. Teil A , **1968**, 23 , 2135 – 2136 .
- ¹⁵ Willets K. A.; Van Duyne R. P.; Annu. Rev. Phys. Chem. **2007**, 58, 267-297.
- ¹⁶ Gold Nanoparticles: Optical Properties", nanoComposix europe (<http://nanocomposix.eu/pages/gold-nanoparticles-optical-properties>, consultado a 9 Setembro).
- ¹⁷ Williams L.; Adams, W.; "nanotechnology demystified- a self-teaching Guide", McGraw-Hill, 2007.
- ¹⁸ Iravani S.; Green Chem., **2011**, 13, 2638-2650.
- ¹⁹ Gopal, R.; "Synthesis of nanomaterials", publicado em 01 Dezembro, **2014**
<http://www.slideshare.net/RamalingamGopal/sol-gel-synthesis-of-nanoparticles>
- ²⁰ Shukla, R.; Nune, S. K.; Chanda, N.; Katti, K.; Mekapothula S.; Kulkarni, R. R.; Welshons, W. V.; Kannan R.; Katti K.V.; small, **2008**, volume 4, No. 9, 1425–1436.
- ²¹ Agnihotri S.; Mukherji ; RSC Adv., **2014**, 4, 3974-3983.
- ²² Lake E.; "Van der Waals Forces & Static Electricity: How They Affect Bacillus Spores", 28 Maio 2008. <http://www.anthraxinvestigation.com/SporeInteraction.html>
- ²³ Han J.; Liu Y.; e Guo R.; Adv. Funct. Mater. **2009**, 19, 1112–1117
- ²⁴ Umer A.; Naveed S.; Ramzan N.; Rafique M. S.; NANO: Brief Reports and Reviews, **2012**, 7, 5, 1230005 (18 pag.)
- ²⁵ Ishida T, Haruta M., Angew. Chem. Int. Ed. **2007**, 46, 7154
- ²⁶ He, S.; Guo, Z.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Gu, J.W.; Mater. Lett. **2007**, 61, 3984-3987.
- ²⁷ Southam, G.; Beveridge, T.J., Geochim. Cosmochim. Acta., **1996**, 60, 4369-4376
- ²⁸ Ahmad, A.; Mukherjee, P.; Senapati, S.; Mandal, D.; Khan, M.I.; Kumar, R.; Sastry, M. Colloids Surf. B **2003**, 28, 313-318.
- ²⁹ Ankamwar, B., E-Journal of Chemistry, **2010**, 7, 1334-1339.

- ³⁰ Huang, J.; Li, Q.; Sun, D.; Lu, Y.; Su, Y.; Yang, X.; Wang, H.; Wang, Y.; Shao, W.; He, N.; Hong, J.; Chen, C. *Nanotechnology* **2007**, 18, 105104-105115.
- ³¹ Santos, S.A.O.; Pinto, R.J.B.; Rocha, S.M.; Marques, P.A.A.P.; Neto, C.P.; Silvestre, A.J. D.; Freire, C.S.R. *ChemSusChem* **2014**, 7, 2704 -2711.
- ³² Kharissova, O.V.; Dias, H.V.R.; B. I. Kharisov, B.I.; Pérez, B.O.; Pérez, V.M.J. *Trends in Biotechnology* **2013**, 31, 240-248.
- ³³ Türkoğlu, M.; Uğurlu, T.; Gedik, G.; Yılmaz, A.M.; Yalçın, A.S. *Drug. Discov. Ther.* **2010**, 4(5), 362-367.
- ³⁴ "Os antioxidantes", *Food Ingredients Brasil*, nº 6, 2009, disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>
- ³⁵ Mody V. V.; Siwale R.; Singh A.; Mody H. R.; *J Pharm Bioallied Sci.* **2010**, 2, 4, 282-289.
- ³⁶ Hvolbæk, B.; Janssens, T. V. W.; Clausen, B. S.; Falsig, H.; Christensen, C. H.; Nørskov J. K.; *Nanotoday*, **2007**, 2, 4, 14-18
- ³⁷ Sudeep, P. K.; Kamat, P. V.; *Chem. Mater.* **2005**, 17, 5404-5410,
- ³⁸ Zhang , Q.; Park, K.; Xi, J.; Myers, D.; Cao, G.; *Adv. Energy Mater.* **2011**, 1, 988–1001,
- ³⁹ Kumar, A.; Vemula, P.K.; Ajayan, P.M.; John, G. *Nat. Mater.* **2008**, 7, 236-241.
- ⁴⁰ (a) Tian, J.; Wong, K.; Ho, C.; Lok, C.; Yu, W.; Che, C.; Chiu, J.; Tam, P.; *Chem. Med. Chem.*, 2007, 2, 129-136. (b) Li, Y.; Leung, P.; Yao, L.; Song, Q. W.; Newton, E.; *J. Hosp. Infect.*, **2006**, 62, 58-63. (c) Furno, F.; Morley, K. S.; Wong, B.; Sharp, B. L.; Arnold, P. L.; Howdle, S. M.; Bayston, R.; Brown, P. D.; Winship, P. D.; Reid, H. J.; *J. Antimicrob. Chemother.*, **2004**, 54, 1019-1024
- ⁴¹ Naja, G.; Bouvrette, P.; Champagne, J.; Brousseau, R.; Luong, J.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, 162, 460-475.
- ⁴² (a) Yang, J.; Wang, H.; Wang, Z.; Tan, X.; Song, C.; Zhang, R.; Li, J.; Cui, Y.; *Chin. Optic. Lett.*, **2009**, 7, 894–897. (b) Braun, E.; Eichen, Y.; Sivan, U.; Ben-Yoseph, G.; *Nature*, **1998**, 391, 775.
- ⁴³ El-Nour, K.M.M.A.; Eftaiha, A.; Al-Warthan, A.; Ammar, R. A. A.; *Arabian Journal of Chemistry*, **2010**, 3, 135–140
- ⁴⁴ Martínez-Castañón, G. A.; Niño-Martínez, N.; Martínez-Gutierrez, F.; Martínez-Mendoza, J. R.; Ruiz, F.; *J Nanopart Res*, **2008**, 10, 1343–1348
- ⁴⁵ Prabhu S. and Poulouse E., *International Nano Letters* **2012**, 2:32
- ⁴⁶ Thielecke, N.; Aytemir, M.; Pruesse, U. *Catal. Today* **2007**, 121, 115-120.
- ⁴⁷ Haruta, M. *Chem. Rec.* **2003**, 3, 75-87.
- ⁴⁸ Adad, A.; Concepción, P.; Corma, A.; García, H.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 4066-4069.
- ⁴⁹ Carreira, S.; Guzman, J.; Corma, A.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 2242-2245.
- ⁵⁰ Nkosi, B.; Adams, M. D.; Coville, N. J.; Hutchings, G. J.; *J. Catal.* **1991**, 128, 378-386.
- ⁵¹ Landon, P.; Collier, P. J.; Papworth, A. J.; Kiely, C. J.; Hutchings, G. J.; *Chem. Commun.* **2002**, 18, 2058-2059.
- ⁵² Ciganda, R.; Li, N.; Deraedt, C.; Gatard, S.; Zhao, P.; Salmon, L.; Hernández, R.; Ruiz, J.; Astruc, D.; *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 10126-10129.
- ⁵³ Vincent T.; Guibal T. *Langmuir* **2003**, 19, 8475-8483
- ⁵⁴ Çekiç, S.D.; Filik, H.; Apak, R. *J. Anal. Chem.* **2005**, 60, 1019-1023.

- ⁵⁵ Hervés, P.; Pérez-Lorenzo, M.; Liz-Marzán, L.M.; Dzubiella, J.; Lu, Y.; Ballauff, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 5577-5587.
- ⁵⁶ Wang, C.-C.; Li, J.-R.; Lv, X.-L.; Zhang, Y.-Q.; Guo, G.; *Energy Environ. Sci.*, **2014**, 7, 2831–2867
- ⁵⁷ Muruganandham, M.; Swaminathan, M.; *Dyes Pigm.*, **2004**, 62, 269–275.
- ⁵⁸ Pal, R.; *Internacional Journal of Advanced Chemistry*, **2014**, 2, 27-33.
- ⁵⁹ Cunha, S.; Santana L. L. B.; *Quim. Nova*, **2012**, 35, 3, 642-647.
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422012000300036&script=sci_arttext , consultado a 23 de Julho
- ⁶⁰ (a) Kathiravan, A.; Renganathan, R.; *Polyhedron* **2009**, 28, 1374–1378. (b) Rajh, T.; Saponjic, Z.; Liu, J.; Dimitrijevic, N. M.; Scherer, N. F.; Arroyo, M. V.; Zapol, P.; Curtiss, L. A.; Thurnauer, M. C.; *Nano Lett.*, **2004**, 4, 1017-1023. (c) Rahban, M.; Divsalar, A.; Saboury, A. A.; Golestani, A.; *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 5798–5803. (d) De, M.; You, C.-C.; Srivastava, S.; Rotello, V. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10747-10753. (e) Han, M. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 4954-4955.
- ⁶¹ (a) Kreibig, U.; Vollmer, M.; *Optical Properties of Metal Clusters*; Springer Series in Material Science, No. 25; Springer-Verlag: Berlin, **1995**; pp 187-201. (b) Mirkin, C. A.; Taton, T. A.; *Nature* **2000**, 405, 626-627. (c) Mann, S.; Shenton, W.; Li, M.; Connolly, S.; Fitzmaurice, D.; *Adv. Mater.* **2000**, 12, 147-150.
- ⁶² Colfen, H.; Mann, S.; *Angew. Chem.*, **2003**, 42, 2350-2365.
- ⁶³ Ihmels, H.; Otto, D.; *Top Curr. Chem.*, **2005**, 258, 161-204
- ⁶⁴ Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; *Molecules*, **2009**, 14, 1725-1746.
- ⁶⁵ Imagem disponível em: <https://breakingbiochem.wordpress.com/2014/04/06/nucleotides-and-nucleic-acids-2/>, consultado a 14 Setembro
- ⁶⁶ Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M.; “Engenharia Enzimática”, Lidel, 2003.
- ⁶⁷ Maciel, R. R. G.; Almeida, A. A.; Godinho, O. G. C.; Gorza, F. D. S.; Pedro, G. C.; Trescher, T. F.; Silva, J. R.; de Souza, N. C.; *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 461365. (doi:10.1155/2013/461365)
- ⁶⁸ Imagem disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAfb5QAJ/estrutura-proteinas>, consultado a 14 Setembro
- ⁶⁹ Barbosa, L. R. S.; Ortose, M. G.; Spinozzi, F.; Mariani, P.; Bernstorff, S.; Itri, R.; *Biophys J.*, **2010**, 6; 98, 147–157.
- ⁷⁰ Moreira, M. B.; Franciscato, D. S.; Toledo, K. C. F.; Souza, J. R. B.; Nakatani, H. S.; Souza, V. R.; *Quim. Nova*, 2015, 38, 2, 227-232.
- ⁷¹ Babu, P.J., Sharma, P., Saranya, S., Tamuli, R., Bora, U., *Nanomater. nanotechnol.*, **2013**, 3, Art. 4:2013
- ⁷² Chang, R.C; So, K.F; *Cell Mol Neurobiol*, **2008**, 28, 5, 643-652.
- ⁷³ Sharma, R. K.; Gulati, S.; Mehta, S.; *J. Chem. Educ.*, **2012**, 89, 1316-1318.
- ⁷⁴ Link, S.; El-Sayed, M.A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4212-4217.
- ⁷⁵ Sareen, S.; Mutreja, V.; Pal, B.; Singh, S. *Micropor. Mesopor. Mat.* **2015**, 202, 219-225.
- ⁷⁶ Gu, J.; Fan, W.; Shimojima, A.; Okubo, T. *J. Solid. State Chem.* **2008**, 181, 957-963.
- ⁷⁷ Murugadoss A., Chattopadhyay A., *Nanotechnology*, **2008**, 19, 1.

- Lewis J D, Day M T, MacPherson V J and Pikeramenou Z, *Chem. Commun.* 2006, 1433-1435.
- ⁷⁸ Panigrahi, S.; Basu, S.; Praharaj, S.; Pande, S.; Jana, S.; Pal, A.; Ghosh, S. K.; Pal, T.; *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 4596-4605
- ⁷⁹ Pradhan, N.; Pal, A.; Pal, T. *Langmuir* **2001**, 17, 1800-1802.
- ⁸⁰ Esumi, K.; Miyamoto, K.; Yoshimura, T.; *J. Colloid Interface Sci.* 2002, 254, 402-405..
- ⁸¹ König, R.Y.G.; Schwarze, M.; Schomäcker, R.; Stubenrauch, C. *Catalysts* **2014**, 4, 256-275.
- ⁸² Shahverdi, A. R.; Minaeian, S.; Shahverdi, H.R.; Jamalifar, H.; Nohi, A.; *Process Biochem.*, **2007**, 42, 919-923.
- ⁸³ Nalawade, P.; Mukherjee, T.; Kapoor, S. *Advances in Nanoparticles* **2013**, 2, 78-86.
- ⁸⁴ Fenger, R.; Fertitta, E.; Kirmse, H.; Thünemann, A.F.; Rademann, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 9343-9349.
- ⁸⁵ Sisa, M.; Bonner, S. L.; Ferreira, D.; Van der Westhuizen, J. H.; *Molecules*, **2010**, 15, 5196-5245;
- ⁸⁶ Wunder, S.; Lu, Y.; Albrecht, M.; Ballauff, M. *ACS Catal.* **2011**, 1, 908-916
- ⁸⁷ Mahmoud, A.M.; Garlyyev, B.; El-Sayed, M.A. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 21886-21893
- ⁸⁸ Antonels, N.C.; Meijboom, R. *Langmuir* **2013**, 29, 13433-13442
- ⁸⁹ Pozun, Z.D.; Rodenbusch, S.E.; Keller E.; Tran K.; Tang W.; Stevenson K.J.; Henkelman G. J. *Phys. Chem. C*. **2013**, 117, 7598-7604
- ⁹⁰ News, D.M., *Phys. Rev.* **1969**, 178, 1123-1135
- ⁹¹ Hammer, B.; Nørskov, J.K., *Nature* **1995**, 376, 238-240
- ⁹² Lin, C.; Tao, K.; Hua, D.; Ma, Z.; Zhou, S. *Molecules* **2013**, 18, 12609-12620.
- ⁹³ Shekhar, M.; Wang, J.; Lee, W.-S.; Williams, W.D.; Kim, S.M.; Stach, E.A.; Miller, J.T.; Delgass, W.N.; Riberio, F.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4700-4708.
- ⁹⁴ Shimizu, K.; Miyamoto, Y.; Kawasaki, T.; Tanji, T.; Tai, Y.; Satsuma, A. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 17803-17810.
- ⁹⁵ Valden, M.; Pak, S.; Lai, X.; Goodman, D.W. *Catal. Lett.* **1998**, 56, 7-10.
- ⁹⁶ Laoufi, I.; Saint-Lager, M.-C.; Lazzari, R.; Jupille, J.; Robach, O.; Garaudée, S.; Cabailh, G.; Dolle, P.; Cruguel, H.; Bailly, A. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 4673-4679.
- ⁹⁷ Bartholomew, C. H.; Farrauto R. J.; "Fundamentals of Industrial Catalytic Processes", 2005, 2nd Ed, Wiley.
- ⁹⁸ a) Spiro, M.; Bradley, J. N., Gillard, R. D., Hudson, R. F., Eds.; Academic Press, London, **1973**, 5, 63. b) Gallezot, P.; Laurain, N.; Isnard, P. *Appl. Catal. B*, **1996**, 9, 11. c) Pintar, A.; Levec, J. *Chem. Eng. Sci.*, **1994**, 49, 4391.
- ⁹⁹ Gangula, A.; Podila, R.; Ramakrishna, M.; Karanam, L.; Janardhana, C.; Rao, A. M.; *Langmuir* **2011**, 27, 15268-15274.
- ¹⁰⁰ Clausen, T.; Schwan-Jonczyk, A.; Lang, G.; Schuh, W.; Liebscher, K.D.; Springob, C.; Franzke, M.; Balzer, W.; Imhoff, S.; Maresch, G.; Bimczok, R., "Hair Preparations", John Wiley & Sons, Inc., New York, **2006**.
- ¹⁰¹ Engels, H.; Weidenhaupt, H.; Pieroth, M.; Hofmann, W.; Menting, K.; Mergenhagen, T.; Schmoll, R.; Uhrlandt, S., "Chemicals and Additives", John Wiley & Sons, Inc, New York, **2004**
- ¹⁰² Smiley, R.A. "Phenylene- and Toluenediamines", John Wiley & Sons, Inc., New York, **2000**
- ¹⁰³ Corma, A.; Concepcion, P.; Serna, P. *Angew. Chem.* **2007**, 119, 7404-7407.

- ¹⁰⁴ Wu, W.; Liang, S.; Chen, Y.; Shen, L.; Zheng, H.; Wu, L. *Cat. Commun.* **2012**, 17, 39-42.
- ¹⁰⁵ Imamura, K.; Iwasaki, S.; Maeda, T.; Hashimoto, K.; Ohtanib, B.; Kominami, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 5114-5119.
- ¹⁰⁶ Haber, F. Z. *Angew. Phys. Chem.* **1898**, 22, 506-514.
- ¹⁰⁷ Blaser, H. U. *Science* **2006**, 313, 312-313
- ¹⁰⁸ Corma, A.; Serna, P. *Science* **2006**, 313, 332-334
- ¹⁰⁹ Wunder, S.; Polzer, F.; Lu, Y.; Mei, Y.; Ballauff, M. J. *Phys. Chem. C* **2010**, 114, 8814-8820
- ¹¹⁰ Abdel-Fattah, T. A; Wixtrom, A, *ECS J. S.S.S.*, 2014, 3, M18-M20
- ¹¹¹ Freund, T. J. *Inorg. Nucl. Chem.* **1959**, 9, 256-251
- ¹¹² Carregal-Romero, S.; Perez-Juste, J.; Herves, P.; Liz-Marzan, L.M.; Mulvaney, *Langmuir* **2010**, 26(2), 1271-1277
- ¹¹³ Carregal-Romero, S.; Buurma, N.J.; Perez-Juste, J.; Liz-Marzan, L.M.; Herves, P. *Chem. Mater.* **2010**, 22, 3051-3059
- ¹¹⁴ a) Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *Nano Lett.* **2004**, 4, 1343-1348; b) Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 7194-7195; c) Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 5726-5733.
- ¹¹⁵ Mirkin, M.V.; Yang, H.; Bard, A.J. *J. Electrochem. Soc.* **1992**, 139, 2212-2217.
- ¹¹⁶ Peng, B.; Chao, H.; Sun, B.; Li, H.; Gao, F.; Ji, L.-N.; *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 1487.
- ¹¹⁷ Sasmal, P. K.; Patra, A. K.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R.; *Inorg. Chem.*, **2007**, 45, 11112.
- ¹¹⁸ (a) T. Biver, A. Corti, N. Eltugral, E. Lorenzini, M. Masini, A. Paolicchi, A. Pucci, G. Ruggeri, F. Secco and M. Venturini, *J Nanopart. Res.*, 2012, 14, 681. (b) R. B. P. Elmes, K. N. Orange, S. M. Cloonan, D. C. Williams and T. Gunnlaugsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 15862–15865. (c) Biver, T.; Eltugral, N.; Pucci, A.; Ruggeri, G.; Schena, A.; Secco F.; Venturini, M.; *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 4190–4199.
- ¹¹⁹ (a) Waring, M. J.; *J. Mol. Biol.*, **1965**, 13, 269–274. (b) Rodger A.; Nordén, B.; “Circular dichroism and linear dichroism”, Oxford University Press, Oxford, New York, 1997. (c) Kypr, J.; I. Kejnovská, D. Renčíuk and M. Vorlíčková, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 1713–1725.
- ¹²⁰ Shakir, M.; Azam, M.; Azim, Y.; Parveen, S.; *Polyhedron*, **2007**, 26, 5513–5518.
- ¹²¹ Maheswari, P. U.; Palaniandavar, M.; *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98, 219–230.
- ¹²² Selvakumar, B.; Rajendiran, V.; Maheswari, P. U.; S.-Evans, H.; Palaniandavar, M.; *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 316–330.
- ¹²³ Krishna, A. G.; Kumar, D. V.; Khan, B. N.; Rawal, S. K.; Ganesh, K. N.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 104, 1381.
- ¹²⁴ Pasternack, R. F.; Cacca, M.; Keogh, B.; Stephenson, T. A.; Williams, A. P.; Gibbs, F. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6835.
- ¹²⁵ Zhao, Y.; Zhu, J.; He, W.; Yang, Z.; Zhu, Y.; Li, Y.; Zhang, J.; Guo, Z.; *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 6621.
- ¹²⁶ Qian, W.; Gu, F.; Gao, L.; Feng, S.; Yan, D.; Liao, D.; Cheng, P.; *Dalton Trans.*, **2007**, 1060.
- ¹²⁷ (a) Sigma, D.S.; Mazuder, A.; Perrin, D.M.; *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2295. (b) Jin, L.; Yang, P.; *J. Inorg. Biochem.*, **1997**, 68, 79.

- ¹²⁸ (a) Liu, F.; Meadows, A.; McMillin, D.R.; J. Am. Chem. Soc., **1993**, 115, 6699. (b) Shi, S.; Liu, J.; Li, J.; Zheng, K.C.; Huang, X.M.; Tan, C.P.; Chen, L.M.; Ji, L.N.; J. Inorg. Biochem., **2006**, 100, 385.
- ¹²⁹ Ferreira E. S.; "Interação da albumina do soro bovino(BSA) com substratos sintéticos", Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, **2009**
- ¹³⁰ Lakowicz, J. R., "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum, New York, 3rd ed, 2006.
- ¹³¹ Peters, T.; Adv. Protein Chem., **1985**, 37, 161.
- ¹³² Eftink, M. R.; Ghiron, C. A.; J. Phys. Chem., **1976**, 80, 486.
- ¹³³ Raja, D. S.; Bhuvanesh, N. S. P.; Natarajan, K.; J. Biol. Inorg. Chem., **2012**, 17, 223.
- ¹³⁴ Qu, P.; Lu, H.; Ding, X.Y.; Tao, Y.; Lu, Z.H.; J. Mol. Struct., **2009**, 920, 172.
- ¹³⁵ Yan, H.; Zhao, S.L.; Yang, J.G.; Zhu, X.D.; Dai, G.L.; Liang, H.D.; Pan, F.Y.; Weng, L.; J. Sol. Chem., **2009**, 38, 1183.
- ¹³⁶ Bhogalea, A.; Patelb, N.; Sarpotdara, P.; Mariamc, J.; Dongrec, P.M.; Miotellob, A.; Kotharia, D.C.; Colloid Surf. B: Biointerfaces, **2013**, 102, 257–264.
- ¹³⁷ Jana, N. R.; Sau, T. K.; Pal, T.; Journal of Physical Chemistry B, 1999, 103, 1, 115-121.
- ¹³⁸ Martinez-Castanon, G. A.; Nino-Martinez, N.; Martinez-Gutierrez, F.; Journal of Nanoparticle Research, **2008**, 10, 8, 1343-1348.
- ¹³⁹ Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M.; Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73, 6, 1712-1720.
- ¹⁴⁰ Colonna G. M.; Caronna T.; Marcan dalli B.; Dyes and Pigments, **1999**, 41, 211–20.
- ¹⁴¹ Azmat, R.; Saeed, A.; Eur. Chem. Bull., **2014**, 3(5), 417-421
- ¹⁴² (a) Chakraborty, R.; Chatterjee, S.; Sarkar, S.; Chattopadhyay, P.; J. Biomat. and Nanobiotech., **2012**, 3, 462-468. (b) Shakir, M.; Khan, M. S.; Al-Resayes, S. I.; Baig, U.; Alam, P.; Khand, R. H.; Alame, M.; RSC Adv., **2014**, 4, 39174–39183. (c) Rahban, M.; Divsalar, A.; Saboury, A. A.; Golestani, A.; J. Phys. Chem. C, **2010**, 114, 5798–5803.
- ¹⁴³ Site do Centro Estrutural de Química (CQE), IST, disponível em: <http://cqe.ist.utl.pt/facilities/facilities.php>, consultado a 10 Setembro.
- ¹⁴⁴ Site Geochemical Instrumentation and Analysis, "X-ray Powder Diffraction (XRD)", disponível em: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html, consultado a 10 Setembro
- ¹⁴⁵ Nagano, S.; Shimada, H.; Tarumi, A.; Hishiki, T.; Kimata-Ariga, Y.; Egawa, T.; Suematsu, M.; Park, S.; Adachi, S.; Shiro, Y.; Ishimura, Y.; Biochemistry, **2003**, 42, 14507-14514
- ¹⁴⁶ Pdf, "Ultraviolet/visible spectroscopy" disponível em: <http://media.rsc.org/Modern%20chemical%20techniques/MCT4%20UV%20and%20visible%20spec.pdf>
- ¹⁴⁷ Pdf, "Espectroscopia de absorção e de fluorescência", disponível em: http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/17692/17692_4.PDF
- ¹⁴⁸ Site da marca Bruker, disponível em: <https://www.bruker.com/products/mr/nmr.html>, consultado a 10 de Setembro.
- ¹⁴⁹ Site do Centro de Química Estrutural- Instituto Superior Técnico, disponível em: <http://cqe.ist.utl.pt/facilities/facilities.php#7>, consultado a 10 de Setembro.
- ¹⁵⁰ Determination of DNA Concentration and Purity by Ultraviolet Spectrophotometry, disponível em: <http://people.rit.edu/~rhrsbi/GEPages/LabManualPDF5ed/09%20UV%20Absorption.pdf>

-
- ¹⁵¹ Reichmann, M.E.; Rice, S.A.; Thomas, C.A.; Doty, P.; J. Am. Chem. Soc., **1954**, 76, 3047.
- ¹⁵² Pyle, A.M; Rehmann, J. P.; Meshoyrer, R.; Kumar, C. V.; Turro, N. J.; Barton, J. K.; J. Am. Chem. Soc., **1989**, 111, 3051.
- ¹⁵³ Karlin, K.D.; Cohenn, I.; Hayes, J. C.; Farooq, A.; Zubieta, J.; Inorg. Chem., **1987**, 26, 47.
- ¹⁵⁴ Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M.; Biochemistry, **1982**, 21, 3933-3940.
- ¹⁵⁵ G. Cohen, H. Eisenberg, Biopolymers 8 (1969) 45.
- ¹⁵⁶ Pashayi, K.; Fard, H. R.; Lai, F.; Iruvanti, S.; Plawsky, J.; Borca-Tasciuc, T.; Nanoscale, **2014**, 6, 4292-4296
- ¹⁵⁷ Zhang, Y.; Cui, X.; Shi, F.; Deng Y.; Chem. Rev., **2012**, 112, 2467–2505
- ¹⁵⁸ Söderstjerna, E.; Bauer, P.; Cedervall, T.; Abdshill, H.; Johansson, F.; Johansson, U. E.; PLoS One, **2014**, 9(8): 105359.
- ¹⁵⁹ Tisch, U.; Schlesinger, I.; Ionescu, R.; Nassar, M.; Axelrod, N.; Robertman, D.; Tessler, Y.; Azar, F.; Marmur, A.; Aharon-Peretz, J.; Haick, H.; Nanomedicine (Lond), **2013**, 8, 1, 43-56
- ¹⁶⁰ a Kannan, R.; Zambre, A.; Chanda, N.; Kulkarni, R.; Shukla, R.; Katti, K.; Upendran, A.;*Cutler, C.; Boote, E.; Katti, K. V.; Nanomedicine and Nanobiotechnology, **2012**; 4, 1, pp. 42–51; b) Shukla, R.; Chanda, N.; Zambre, A.; Upendran, A.;* Katti, K.; Kulkarni, R. R.; Nune, S. K.; Smith, C. J.; Vimal, J.; Boote, E.; Robertson, J. D.; Kan, P.; Engelbrecht, H.; Watkinson, L. D.; Carmack, T. L.; Lever, J. R.; Cutler, C. S.; Caldwell, C.; Kannan, R.; Katti, K. V.; Proceedings of the National Academy of Sciences-PNAS-2012, **2012**, 109, 31; 12426-12431

VIII – ANEXOS

VIII.1 – ANEXO A

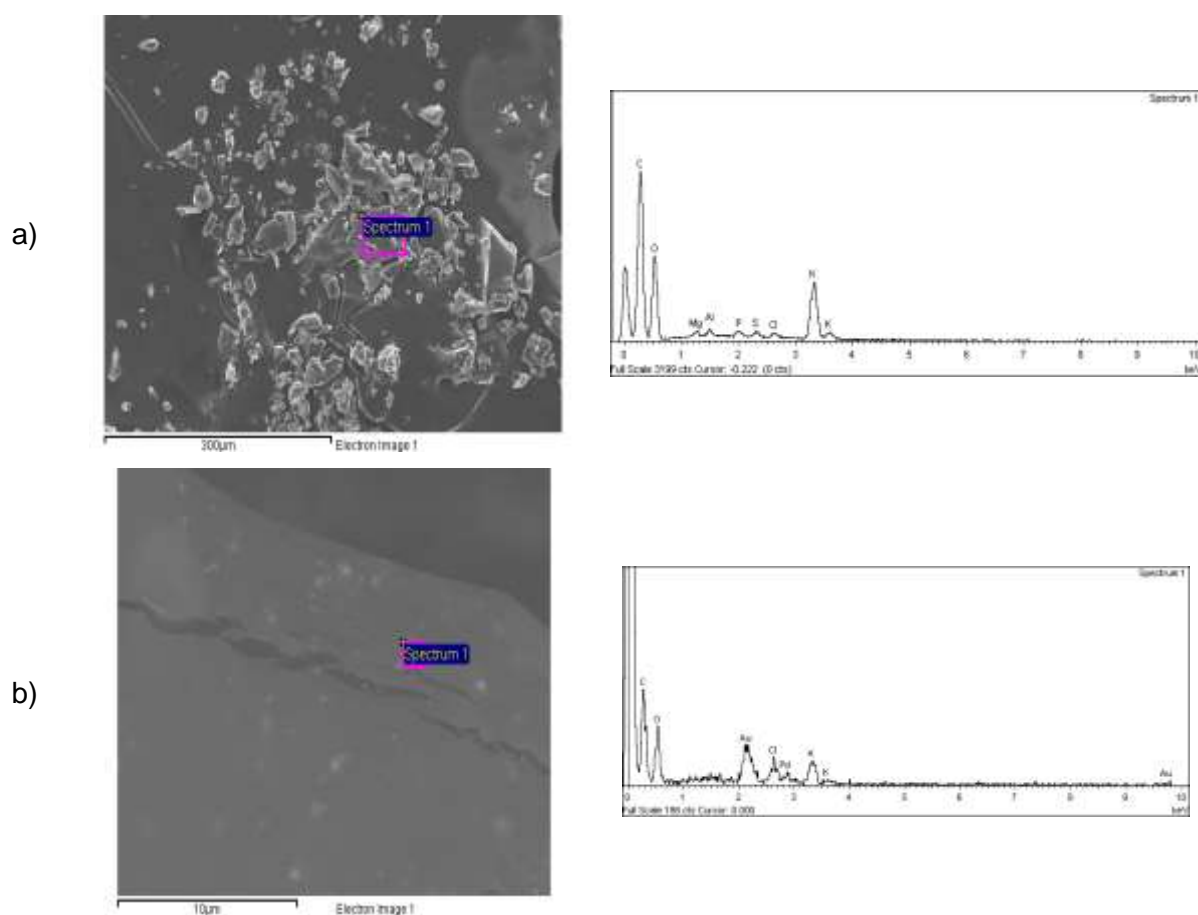


Figura I - Análise EDS aos extratos de **chá 1** e **2** de diferentes concentrações, com AuNPs formadas.
a) 10% AuNPs (**chá 1**); b) 10% AuNPs (**chá 2**).

VIII.2– ANEXO B

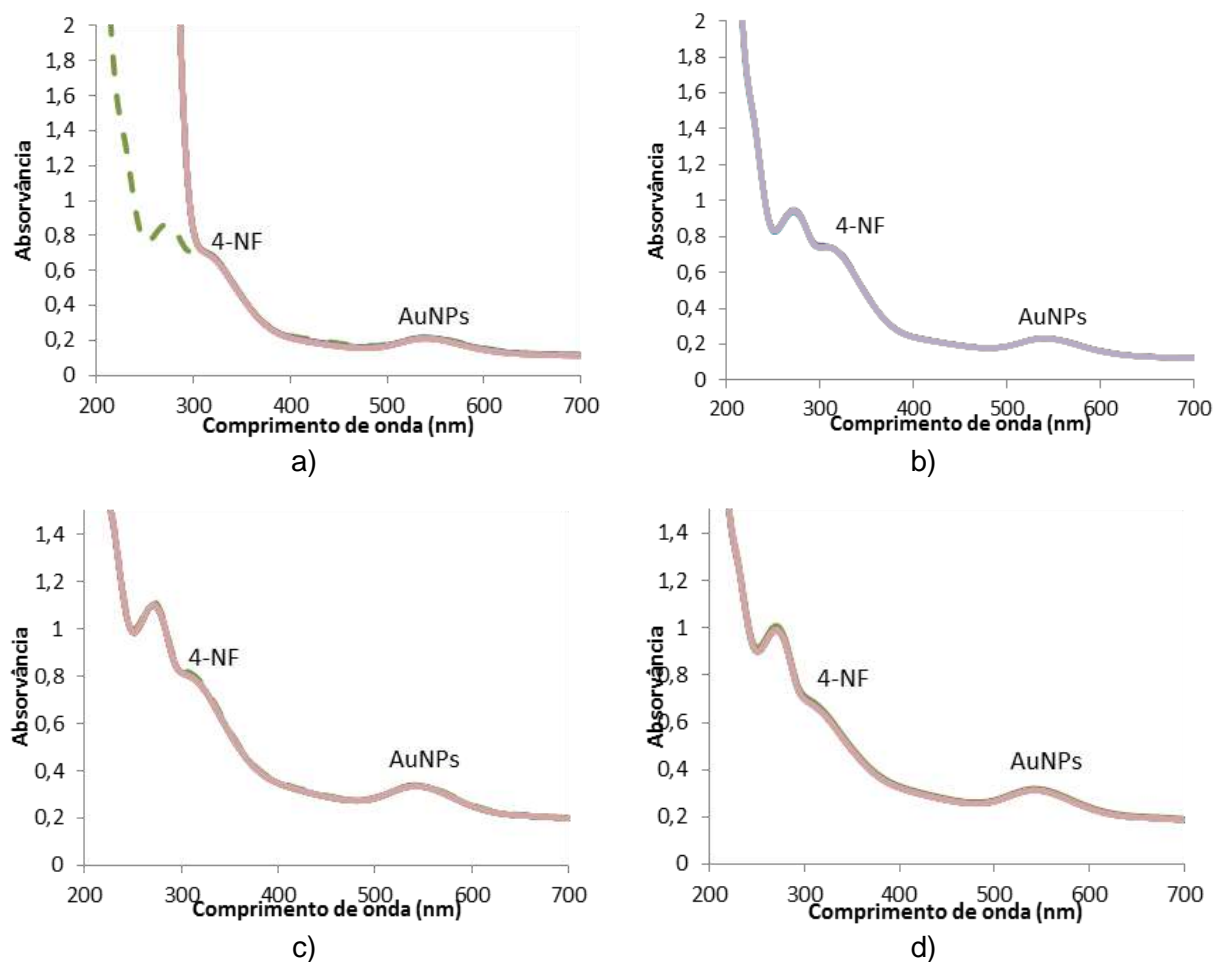


Figura II - Espectro UV-Vis da reacção de redução do 4-NF catalisada por AuNPs e utilizando diferentes agentes redutores. a) ácido ascórbico, b) Cloreto de amónio, c) Trietilsilano, d) D-glucose. Condições reaccionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{agente redutor}] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

VIII.3– ANEXO C

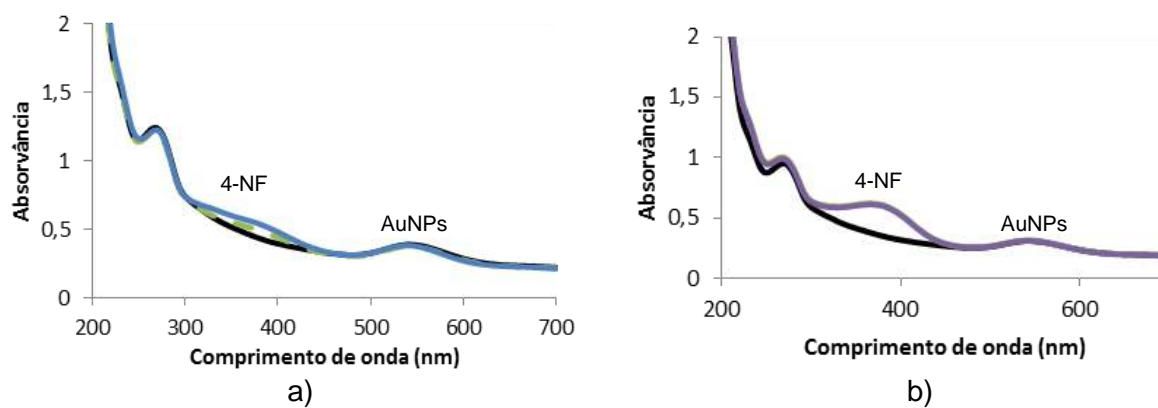


Figura III - Espectro UV-Vis da reacção de redução da 4-NA catalisada por AuNPs e utilizando diferentes agentes redutores. a) hidrazina, b) D-glucose. Condições reaccionais: $[AuNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NA] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{agente redutor}] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

VIII.4– ANEXO D

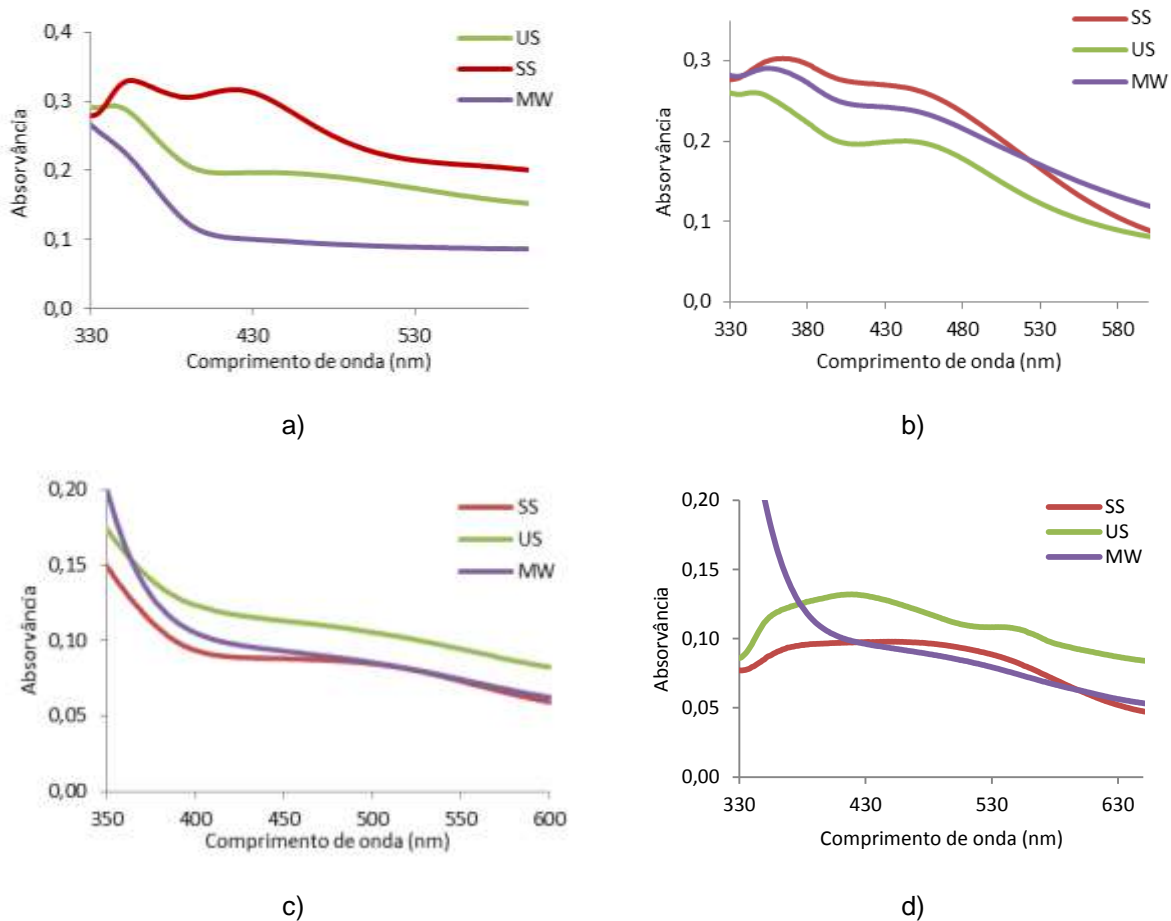
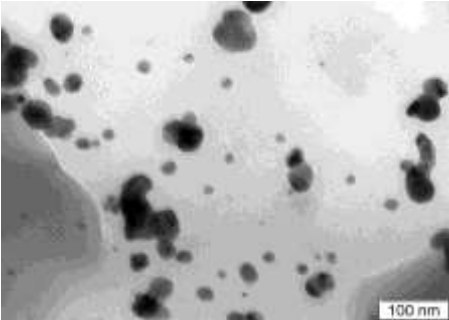
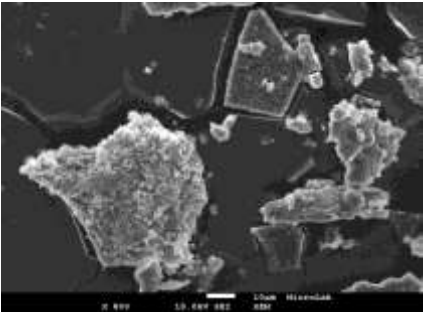
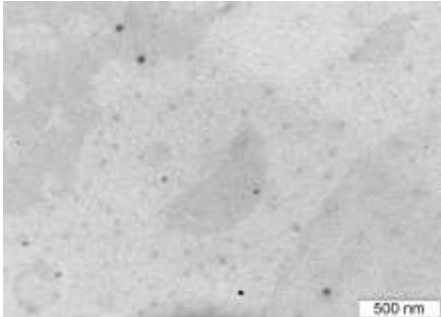
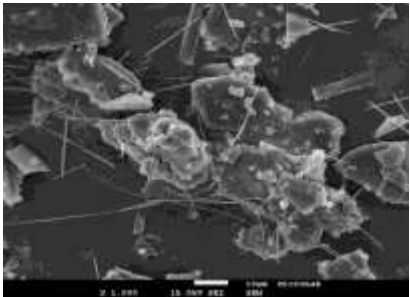
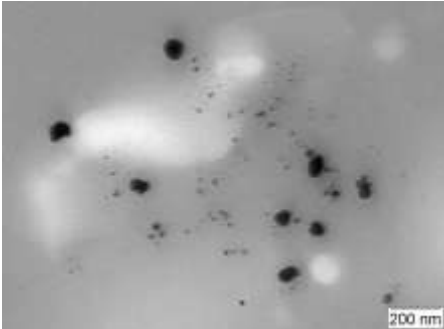
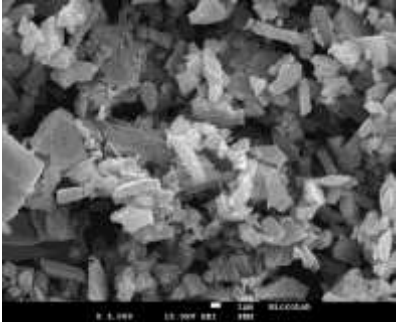
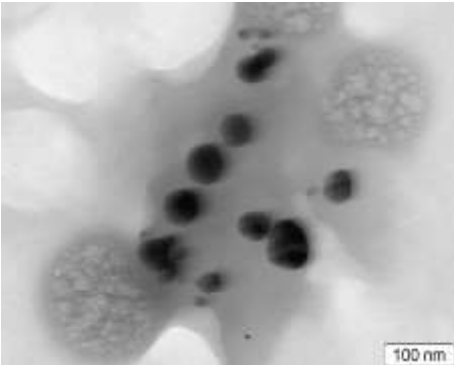
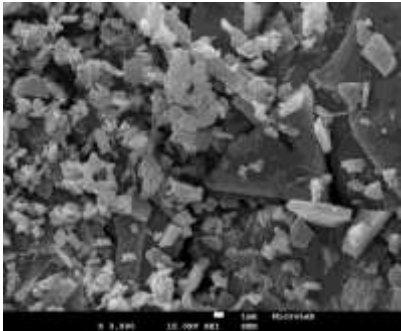
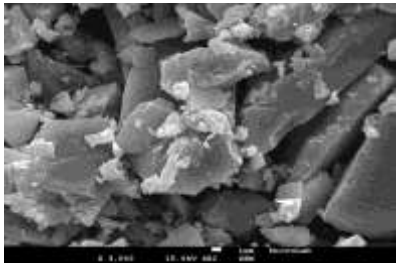
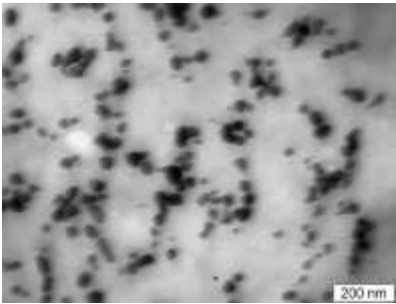


Figura IV - Espectros de UV-Vis das bandas das AgNPs formadas através de diferentes métodos e utilizando a) **chá 3**, b) **chá 4**, c) **chá 5** e d) **chá 6**.

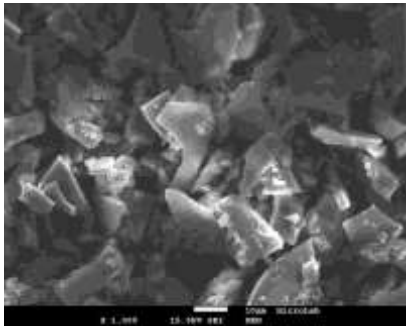
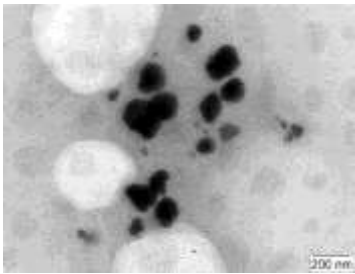
VIII.5– ANEXO E

Entrada	Chá	Método sintético	TEM	SEM
1		Normal		
2		MW		
3	1	US		
4		MW temp		

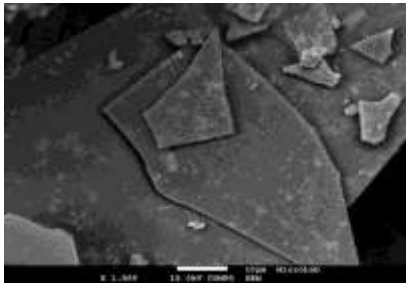
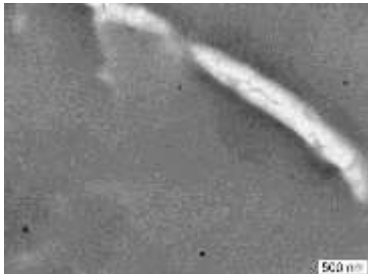
5 Normal



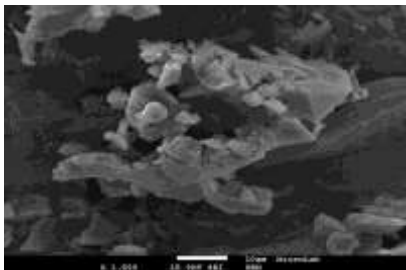
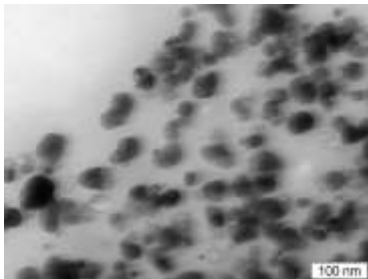
6 3 MW



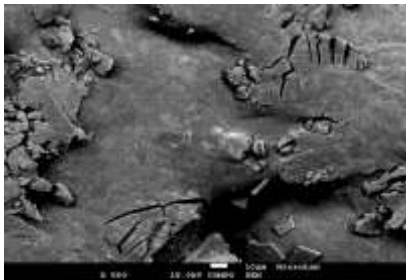
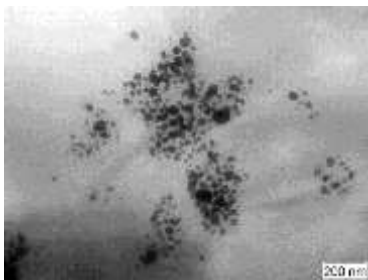
7 US



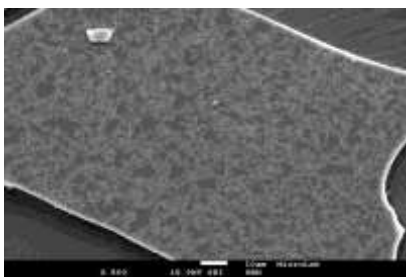
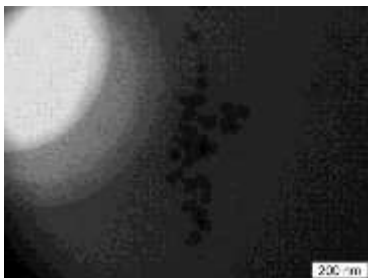
8 Normal



9 4 MW



10 US



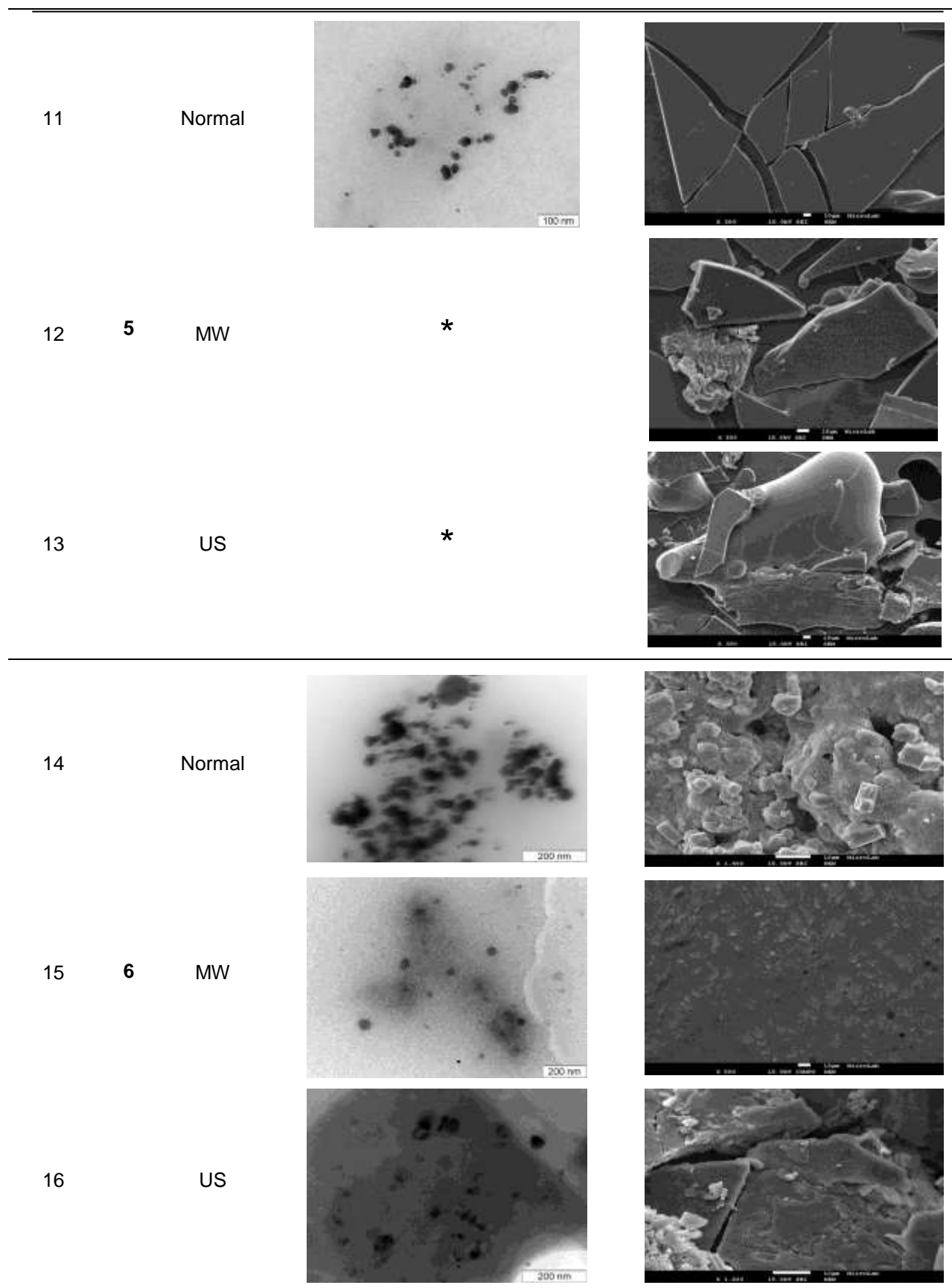


Figura V – Imagens de TEM e SEM das AgNPs sintetizadas por diferentes chás e por diferentes metodologias.

* as amostras quando analisadas por TEM apresentaram aglomerados com tamanhos superiores a 100 nm, impossibilitando a determinação do seu tamanho, por esta técnica.

VIII.6– ANEXO F

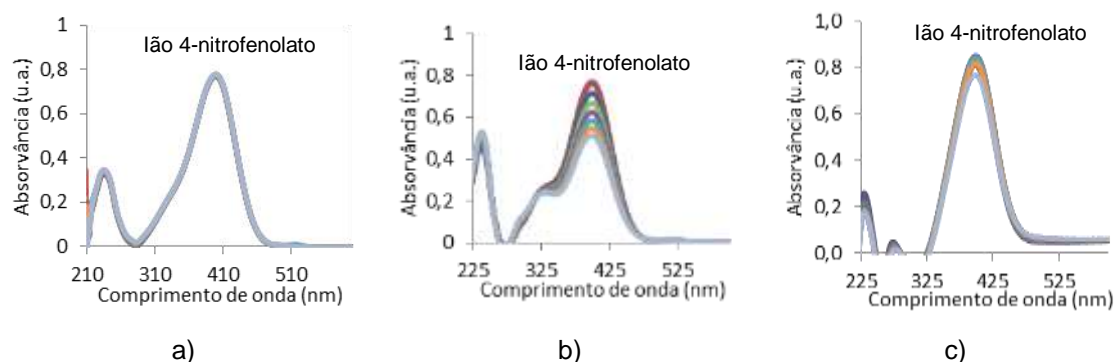


Figura VI - Redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método MW, por diferentes extratos de chá: a) **Chá 2**; b) **Chá 3**; c) **Chá 6**. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

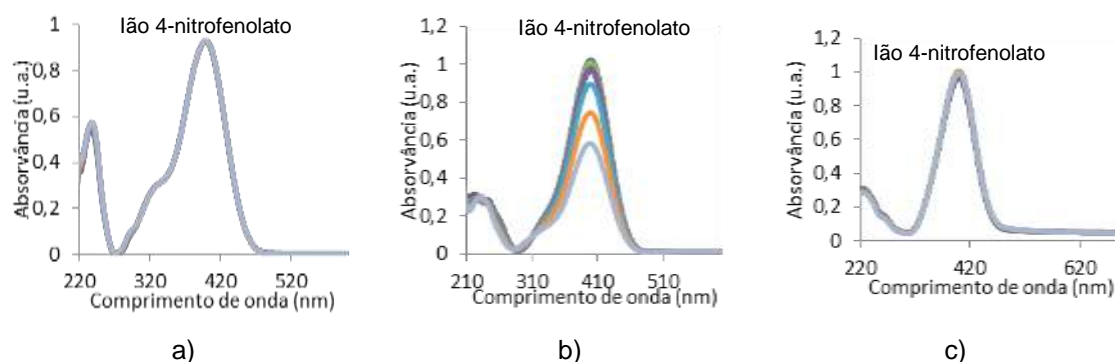


Figura VII - Redução do 4-NF na presença de AgNPs sintetizadas pelo método US por diferentes extratos de chá: a) **Chá 3**; b) **Chá 4**; c) **Chá 6**. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[4-NF] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

VIII.7– ANEXO G

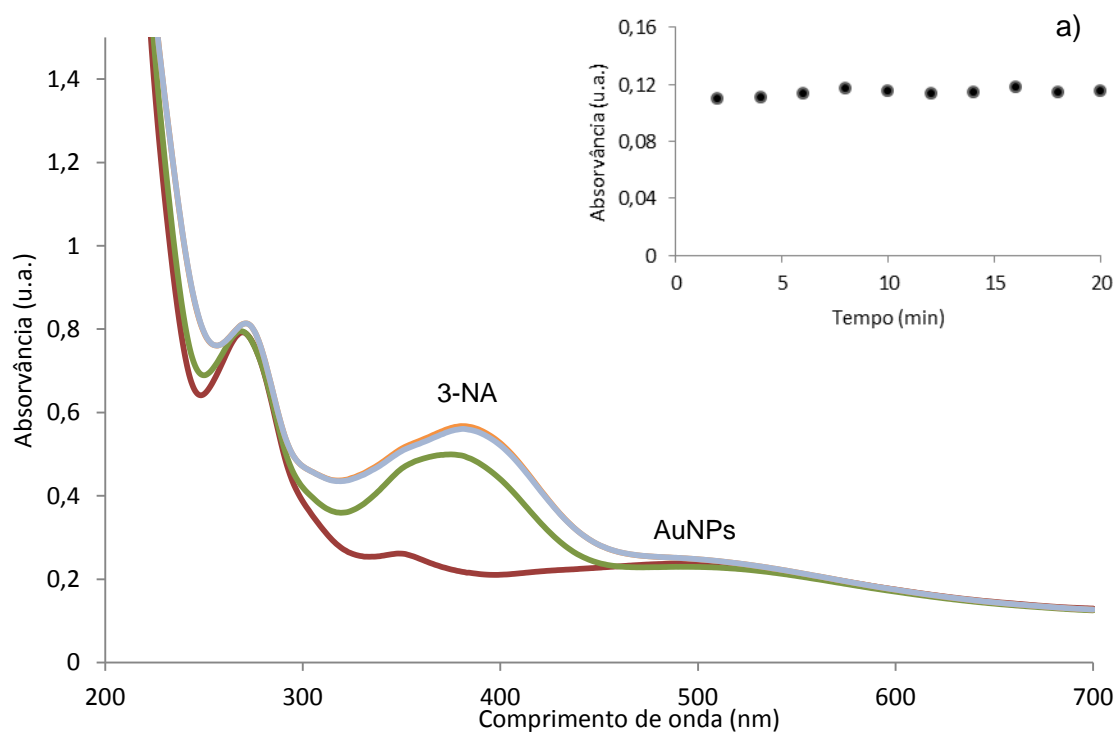


Figura VIII - Redução da 3-NA catalisada por 1% AgNPs. Condições reacionais: $[AgNPs] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[3\text{-NA}] = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[NaBH_4] = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$. a) Absorvância a 380 nm vs. tempo de reação.

VIII.8– ANEXO H

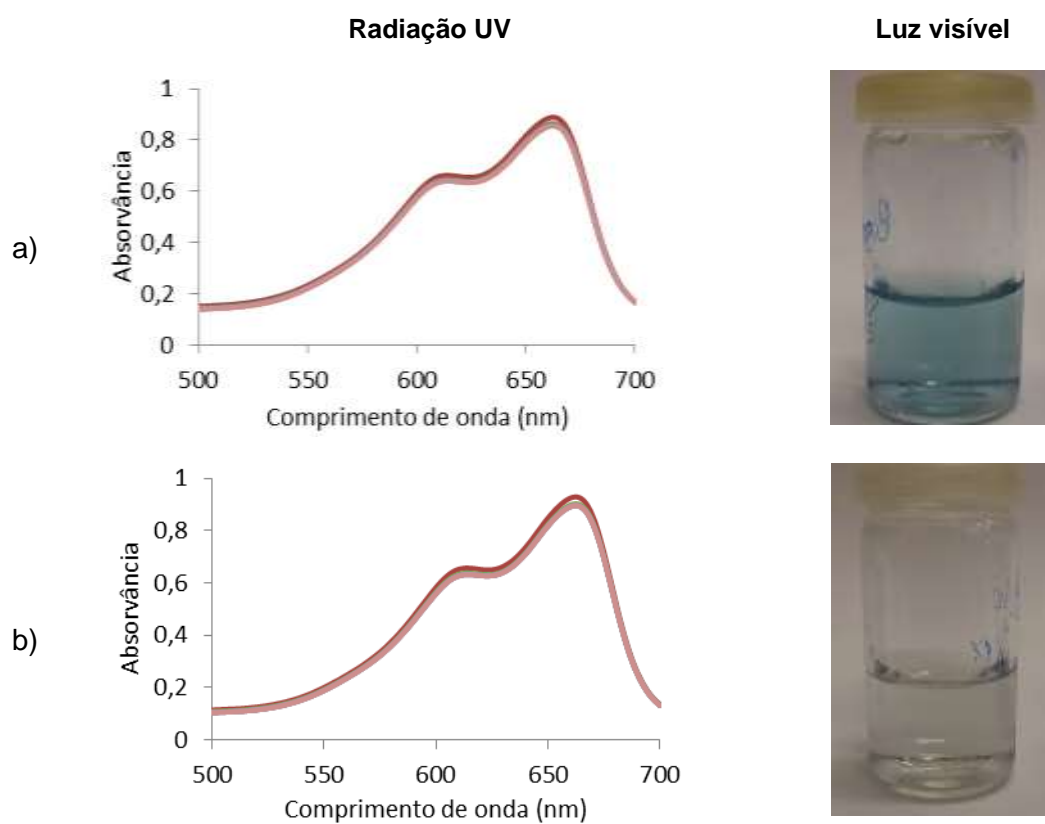


Figura IX - Estudos da degradação do corante azul metileno, com irradiação UV e luz visível, para variações do rácio de extrato de chá com AgNPs/agente oxidante. a) [catalisador]= $2,65 \times 10^{-5}$ M e $[H_2O_2]= 5,69 \times 10^{-2}$ M; b) [catalisador]= $1,06 \times 10^{-5}$ M e $[H_2O_2]= 0,23$ M